

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

CARLA REGINA ANDRIGHETTI-FRÖHNER

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE
DIFERENTES CLASSES DE COMPOSTOS SINTÉTICOS**

**Florianópolis
2008**

CARLA REGINA ANDRIGHETTI-FRÖHNER

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE
DIFERENTES CLASSES DE COMPOSTOS SINTÉTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química, da Universidade Federal de Santa
Catarina, como requisito parcial para obtenção do
grau de Doutor.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Nunes

Co-orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira
Simões

**Florianópolis
2008**

Carla Regina Andrighetti-Fröhner

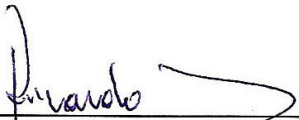
**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE
DIFERENTES CLASSES DE COMPOSTOS SINTÉTICOS**


Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Doutor em
Química no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade
Federal de Santa Catarina**

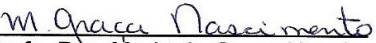
Florianópolis, 14 de março de 2008.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa


BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ricardo José Nunes
Orientador

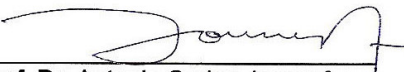

Profa. Dra. Helena Carla Castro
Relatora (UFF - Dep. de Biologia Celular
e Molecular)


Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento
(UFSC – Dep. Química)


Prof. Dr. Mario Stendel
(UFSC – Dep. Microbiologia e Parasitologia)


Profa. Dra. Cláudia Maria O. Simões
Co-orientadora


Prof. Dr. Carlos Frederico Leite Fontes
(UFRJ – Dep. Bioquímica)


Prof. Dr. Antonio Carlos Joussef
(UFSC – Dep. Química)

Dedico este trabalho ao meu Amor, Gilson, pelas alegrias, pelo companheirismo em todos os momentos, pela paciência, por acreditar em mim e por estar sempre ao meu lado. Obrigada pelos sonhos que plantamos no jardim das nossas vidas e pelas flores que colhemos e que iremos colher.

Me too!!!

AGRADECIMENTOS

À Deus por minha vida ser tão maravilhosa, cheia de tantas bênçãos e alegrias. Louvo-Te Senhor por me permitir viver dia a dia na Tua Presença!!

Aos meus pais Carlos e Lori, o meu muito obrigada pelo amor incondicional em todas as fases de minha vida, pela presença constante e pelo exemplo de vida. Amo vocês!!!

À Luciane e ao Fábio pelo amor que nos une, pelo carinho e por serem meus irmãos maravilhosos.

À D. Clotilde e ao Seu Rubens pelo carinho, pela atenção e pelo incentivo.

Aos meus cunhados Mariele e Gilmar, Gerson e Vanda, Daniela e aos meus sobrinhos Tiago, Diego, Luiz Gustavo e Victor pelo carinho, pela compreensão e pelas palavras de incentivo.

À Professora Cláudia Maria Oliveira Simões pela valiosa orientação, pelo carinho, pelo incentivo na busca de novos caminhos e pelo exemplo de vida. Obrigada por estes anos de convivência cheios de alegrias, persistências, realizações e confiança.

À Professora Célia Regina Monte Barardi pelo carinho, pelas sugestões, apoio e amizade em todos os momentos.

Ao Professor Ricardo José Nunes pela orientação e pela amizade.

Às grandes amigas Thaís e Caroline pela amizade, pelas alegrias, por fazerem parte da minha vida e tornarem especiais os momentos de convívio.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Aplicada, Vanessa, Juliana, Alexandre, Márcia, Flávio, Débora, Thiago, Cristiane, Deise, Jonas, Vanessinha, Adriane, Jadel, Aline, Matias, Francielle pelo companheirismo, pelos momentos de alegria e amizade.

À amiga Kely pelo carinho, pela amizade e pelo auxílio na realização desta tese. Valeu darmos um passo além das fronteiras!!!!

Aos amigos do Laboratório Química pelo companheirismo e amizade. Ao Luiz Everson da Silva por ter cedido alguns compostos.

Ao Professor Antonio Carlos Joussef pelo apoio, pelos ensinamentos e por ter gentilmente cedido alguns compostos.

Ao Professor Adailton J. Bortoluzzi por ter realizado as análises de Raios-X.

À Sabine Foro, técnica do Departamento de Ciência dos Materiais da TU-Darmstadt pelas análises de Raios-X dos compostos.

Ao Professor Mário Steindel pela oportunidade de desenvolver em seu laboratório os ensaios antiparasitários.

À Letícia K. Pacheco por ter me ensinado e ajudado a realizar os ensaios antiparasitários. À Daniela Gaspar Silva por ter realizado os ensaios antiparasitários.

Ao Professor Edmundo Grisard pelos auxílios, pelo apoio e ensinamentos.

Ao Professor Marcos M. Sá, ao Gustavo P. Silveira e à Lidiane Méier por terem gentilmente cedido alguns compostos.

Ao Professor Tomas Bergström pela calorosa acolhida e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório no Departamento de Virologia Clínica da Universidade de Göteborg/Suécia.

Ao Professor Edward Trybala pelos ensinamentos e aos amigos do Departamento de Virologia Clínica da Universidade de Göteborg/Suécia, Beata, Maria, Carolina, Anette, Berit, Sofia, Joanna, Anna, Katie, Gaby, Jan-Åke, Staffan, Peter, Mona, Sigvard e Clementina pela calorosa acolhida em seu país, pelos momentos de alegria e amizade.

À doutoranda Joanna Said do Departamento de Virologia Clínica da Universidade de Göteborg/Suécia pela avaliação da atividade anti-HIV dos compostos.

À Georgette e o Tord pelo coração enorme e pela casa em Göteborg e à Tininha, Quinta e Rafael pela casa no Rio de Janeiro.

À Professora Izabel C. P. P. Frugulhetti pela oportunidade de realizar um treinamento em seu Laboratório de Virologia Molecular da Universidade Federal Fluminense.

À Professora Helena Carla Castro, ao Professor Carlos R. Rodrigues e a aluna de mestrado Alessandra M.T. de Souza pela realização dos estudos de modelagem molecular.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química.

À Grace e ao Jadir pelo apoio e sempre disponibilidade.

Ao CNPq pela concessão das bolsas e pelo apoio financeiro.

Aos professores, colegas e amigos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização desta tese.

À vida, por ser tão maravilhosa, cheia de tantas alegrias, tantos momentos especiais, tantas oportunidades, tantas amizades, tantas risadas, tantas noites de trabalhos, tantos finais de semana, tantos acertos e erros, tantos exemplos, tantas flores, tantas felicidades, tantos sonhos e tantas realidades. Obrigada Deus!!!!

RESUMO

Durante os últimos anos a pesquisa de novos fármacos antivirais passou por grandes avanços, com a descoberta de novos alvos moleculares e com o desenvolvimento da síntese orgânica, o que tem resultado em substâncias bioativas mais eficazes e/ou menos tóxicas, que podem ser utilizadas como modelos de novos fármacos. Este trabalho teve como objetivo sintetizar sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona e sulfonamidas derivadas da quinolina; avaliar a potencial atividade antiviral desses compostos e de outros 150 compostos; e elucidar o mecanismo da ação antiviral do composto mais ativo. Assim, os efeitos inibitórios dos compostos sobre a replicação do Herpes Simplex Virus tipo 1 (HSV-1) e do rotavírus (RV-SA11) foram avaliados através do ensaio do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-difeniltetrazólio]; e os efeitos dos compostos sobre a replicação do Herpes Simplex Virus tipo 2 (HSV-2) e do vírus sincicial respiratório (RSV) foram avaliados através do método de inibição da formação de placas de lise. Com base nos resultados destas triagens, os compostos mais ativos foram selecionados para uma avaliação detalhada do seu mecanismo de ação, através de várias estratégias metodológicas, tais como: avaliação da ação virucida; avaliação da interferência na dispersão dos vírus célula a célula, na expressão de proteínas virais, na síntese do DNA viral e na ligação dos vírus às glicosaminoglicanas das superfícies celulares; e a preparação e avaliação da sensibilidade de variantes do HSV resistentes. As sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona e as sulfonamidas derivadas da quinolina apresentaram fraca inibição da replicação dos vírus testados e baixos índices de seletividade e não foram selecionados para a continuidade dos estudos. Os resultados dos processos de triagem mostraram que o composto **98** (2,2-dimetil-5-[(1,3,4-tiadiazol-2-amino)metileno]-1,3-dioxane-4,6-dione) apresentou resultados promissores na inibição da replicação do HSV-1 (cepa 29R/resistente ao aciclovir), uma baixa atividade anti-RSV, e somente 37% de inibição da replicação do vírus HSV-2. Seu mecanismo de ação anti-HSV-1 parece ser mediado, ao menos em parte, pela inibição da dispersão do HSV-1 (cepa 29R) célula a célula e pela interferência em eventos imediatos da replicação deste vírus, através do bloqueio da síntese da proteína α ICP27. Além disso, ele não inibiu a síntese do DNA viral, nem apresentou ação virucida. Adicionalmente, outros dois compostos foram escolhidos: uma celohexaose sulfatada (**167**), e um oligossacarídeo formado por duas unidades de lactose sulfatadas ligadas por um espaçador hidrofóbico específico do tipo C₆H₄ (**183**). Eles apresentaram promissoras atividades anti-RSV e anti-HSV e ausência de ação virucida. O mecanismo da ação antiviral destes oligossacarídeos sulfatados parece ser mediada pela inibição da dispersão célula a célula do HSV e, em alguma extensão, do RSV e pela interferência na ligação de ambos os vírus às glicosaminoglicanas das superfícies celulares. Os resultados indicaram, ainda, que outro(s) componente(s) viral(is), exceto a glicoproteína gC, poderia(m) estar também envolvidos(s) na atividade anti-HSV-1 detectada.

Palavras chaves: atividade antiviral; Herpes simplex virus; rotavírus; vírus sincicial respiratório; mecanismo de ação.

ABSTRACT

During the last years the search for new antiviral drugs has advanced with the discovery of new molecular targets and with a synthetic chemistry development which has resulted in bioactive substances with high efficacy and/or low toxicity and as lead compounds for designing new drugs. This study aimed to synthesize sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives and sulfonamide quinoline derivatives; to evaluate the potential antiviral activity of these compounds and other 150 different compounds; and to elucidate the mechanism of antiviral action of the most active compound. Thus, the inhibitory effects of the compounds on the replication of Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) and rotavirus were evaluated by the MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)]; and the effects of the compounds on the replication of Herpes Simplex Virus type 2 (HSV-2) and the respiratory syncytial virus (RSV) were evaluated by a plaque reduction assay. Based on the results of screening assay, the most active compounds were selected for one detailed evaluation of their mechanism of action, through a variety of approaches, such as: the evaluation of virucidal activity; the interference in the cell-to-cell spread activity of the virus, in viral proteins synthesis, in the viral DNA synthesis, in the virus binding to cell surface glycosaminoglycans; and the preparation of HSV variants resistant to compound. The sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives and sulfonamide quinoline derivatives showed a weak inhibition of viral replication of the tested virus and low selectivity indexes and were not selected for further investigation. The results of the screening assay showed that the compound **98** (2,2-dimethyl-5-[(1,3,4-tiadiazol-2-amino) methylene] -1,3-dioxane-4 ,6-dione) showed a promising anti-HSV-1, strain 29R/acyclovir resistant activity, a weak anti- RSV activity and only a weak inhibition of HSV-2 replication. Its mechanism of anti-HSV-1 action seems to be mediated, at least in part, by reduction of the cell-to-cell spread activity of HSV-1 strain 29R and the interference with the immediate early events of the replication of this virus, through of impaired levels of the α protein ICP27. In addition, the compound showed no inhibition of viral DNA synthesis and caused no inactivation of RSV or HSV particles. Additionally, two other compounds were selected: a sulphated celohexaose (**167**), and a specifically spaced two disaccharide units of sulfated lactose (**183**). They showed promising anti-RSV and anti-HSV-activity and caused no inactivation of RSV or HSV particles. The mechanism of action of these sulphated oligosaccharides seems to be mediated by inhibition of the cell-to-cell spread activity of HSV and to some extent RSV and by interference with the virus binding to cell surface glycosaminoglycans. The results suggested, that viral component other than gC could be the target of the anti-HSV-1 activity.

Keywords: antiviral activity; Herpes simplex virus; rotavirus; respiratory syncytial virus; mechanism of action.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Visão em perspectiva da estrutura molecular do <i>N</i> -Benzil-2-metoxi-5-(3-oxo-3-fenil-1-propenil)-benzenosulfonamida (26). A numeração dos átomos é arbitrária.....	112
Figura 2:	Empacotamento do composto <i>N</i> -Benzil-2-metoxi-5-(3-oxo-3-fenil-propenil)-benzenosulfonamida (26) mostrando as moléculas conectadas através das ligações de hidrogênio representadas pelas linhas tracejadas azul claro.....	113
Figura 3:	Espectro de RMN ¹ H em DMSO-d ₆ do composto 4-[(2,2-dimetil-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-ilideno)metilamino]- <i>N</i> -(<i>N</i> -metoxibenzil)benzenosulfonamida (210).....	118
Figura 4:	Espectro de RMN ¹ H em CDCl ₃ do composto <i>N</i> -[2-(4-metoxifenil)etil]-8-quinolinassulfonamida (44).....	120
Figura 5:	Visão em perspectiva da estrutura molecular do composto <i>N</i> -benzil-8-quinolinassulfonamida (39). A numeração dos átomos é arbitrária.....	121
Figura 6:	Visão em perspectiva da estrutura molecular do composto quinolin-8-il-2,5-diclorobenzenosulfonato (50). A numeração dos átomos é arbitrária.	122
Figura 7:	Empacotamento do composto quinolin-8-il-2,5-diclorobenzenosulfonato (50) mostrando as ligações de hidrogênio representadas pelas linhas tracejadas.....	122
Figura 8:	Efeito do tempo de adição do composto (98) (125 µM) sobre o ciclo de replicação do HSV-1 cepa 29R. Os valores representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.....	137
Figura 9:	Efeito do composto (98) (125 µM) sobre a expressão das proteínas ICP-27 e gD do HSV-1 cepa 29R em células VERO, detectado por <i>Western Blotting</i> . Linha 1: células VERO não infectadas; linha 2: células VERO infectadas com HSV-1 29R; linha 3: células VERO infectadas com HSV-1 29R e tratadas com 125 µM do composto 98	138
Figura 10:	Efeito do composto (98) sobre a dispersão célula a célula do vírus HSV-1 cepa 29R, avaliado através do método de redução do tamanho das placas de lise. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes com duas réplicas cada.....	141

Figura 11: Efeito dos compostos (167) e (183) sobre a infecciosidade do HSV e do RSV, avaliados através do método de redução de formação das placas de lise. Cada ponto representa a média de dois experimentos independentes com duas réplicas cada.....	150
Figura 12: Efeito dos compostos (167) e (183) sobre a dispersão célula a célula do HSV, avaliado através do método de redução do tamanho das placas de lise. Cada ponto representa a média de dois experimentos independentes com duas réplicas cada.....	151
Figura 13: Efeito dos compostos (167) e (183) sobre a adsorção dos vírions purificados e marcados radioativamente do HSV e do RSV às células GMK AH1 e HEp-2, respectivamente. Cada ponto representa a média de dois experimentos independentes com duas réplicas cada.....	152
Figura 14: Efeito dos compostos (167) e (183) sobre a ligação das glicoproteínas gB e gC do HSV-1 e do HSV-2 às células GMK AH1. Cada ponto representa a média de dois experimentos independentes com duas réplicas cada.....	153
Figura 15: Placas do HSV-1 KOS cepa gC nula variante gC ³⁹ resistente (foco grande) e sensível (foco pequeno) ao composto (183), coradas por imunocitoquímica.....	154

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1:	Síntese das sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona utilizando diferentes aminas.....	50
Esquema 2:	Síntese do cloreto da quinolona-3-sulfonila.....	51
Esquema 3:	Síntese da 4-aminobenzenosulfonamida substituída	53
Esquema 4:	Síntese da sulfonamida derivada da quinolona.....	53
Esquema 5:	Síntese das sulfonamidas derivadas da quinolina utilizando diferentes aminas.....	54
Esquema 6:	Triagem da potencial atividade antiviral dos compostos sintéticos (22) a (30) e (52) a (144) através do ensaio do MTT.....	72
Esquema 7:	Triagem da potencial atividade antiviral dos compostos sintéticos (22) a (30), (38) a (50) e (145) a (197) através do ensaio método de redução de formação de placa de lise	75
Esquema 8:	Relação isostérica entre o composto (198) e o composto (199).....	114
Esquema 9:	Rota sintética dos derivados arilaminometilênico do ácido de Meldrum.....	116
Esquema 10:	Síntese da quinolina através da pirólise do derivado aminometilênico do ácido de Meldrum.....	116
Esquema 11:	Termólise do aduto (107)	132

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Tipos de herpesvírus humanos.....	31
Quadro 2:	Etapas do método de redução de formação de placa de lise incluindo as modificações utilizadas para a determinação da CE ₅₀ dos compostos 22 a (30) , (38) a (50) e (145) a (197) em relação ao vírus HSV-2 cepa 333.....	78
Quadro 3:	Seqüência de iniciadores específicos usados para ampliação gênica de um segmento da gB do HSV-1 por PCR em tempo real.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Aminas utilizadas na síntese das sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona.....	51
Tabela 2:	Aminas utilizadas na síntese das sulfonamidas derivadas da quinolina.....	54
Tabela 3:	Aziridinas utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.....	56
Tabela 4:	Imidas cíclicas utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.....	56
Tabela 5:	Sulfonamidas derivadas de succinimidas utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.....	57
Tabela 6:	Sulfonamidas derivadas de maleimidas utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.....	57
Tabela 7:	Sulfonamidas derivadas de <i>N</i> -benzilftalimida utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.....	58
Tabela 8:	Sulfonamidas derivadas de <i>N</i> -benzilnaftalimida utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.....	58
Tabela 9:	Adutos do ácido de Meldrum utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.....	59
Tabela 10:	Adutos do ácido de Meldrum utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.....	60
Tabela 11:	Tiazolpirimidinona e Naftiridinas utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.....	61
Tabela 12:	Quinolinas utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.....	62
Tabela 13:	Outros compostos selecionados para avaliação utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.....	62
Tabela 14:	Oligossacarídeos e polissacarídeos sulfatados utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.....	63
Tabela 15:	Derivados de lactose sulfatados utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.....	64
Tabela 16:	Série de sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona (22 a 30) com os respectivos rendimentos e ponto de	

fusão.....	111
Tabela 17: Comprimento (Å) e ângulo (°) das ligações de hidrogênio do composto (26).....	113
Tabela 18: Série de sulfonamidas derivadas de quinolinas (38 a 48) com os respectivos rendimentos e ponto de fusão.....	119
Tabela 19: Comprimento (Å) e ângulo (°) das ligações de hidrogênio do composto (44).....	120
Tabela 20: Comprimento (Å) e ângulo (°) das ligações de hidrogênio do composto (50).....	122
Tabela 21: Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados.....	124
Tabela 22: Resultados da triagem da potencial atividade anti-HSV-1 e anti-rotavírus das sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona (22 a 30) através do ensaio do MTT.....	126
Tabela 23: Resultados da triagem da potencial atividade anti-HSV-1 e anti-rotavírus dos compostos derivados da aziridina, através do ensaio do MTT.....	126
Tabela 24: Resultados da triagem da potencial atividade anti-HSV-1 e anti-rotavírus dos compostos derivados das imidas cíclicas, das sulfonamidas derivadas de succinimidas, das sulfonamidas derivadas de maleimidas, através do ensaio do MTT.....	127
Tabela 25: Resultados da triagem da potencial atividade anti-HSV-1 e anti-rotavírus dos compostos derivados das sulfonamidas derivadas de <i>N</i> -benzilftalimida e da <i>N</i> -benzilnaftalimida, através do ensaio do MTT.....	128
Tabela 26: Resultados da triagem da potencial atividade anti-HSV-1 e anti-rotavírus dos adutos do ácido de Meldrum, através do ensaio do MTT.....	129
Tabela 27: Resultados da triagem da potencial atividade anti-HSV-1 e anti-rotavírus dos compostos tiazolpirimidinona e das naftiridinas através do ensaio do MTT.....	130
Tabela 28: Resultados da triagem da potencial atividade anti-HSV-1 e anti-rotavírus das quinolinas e de diferentes compostos, através do ensaio do MTT.....	131
Tabela 29: Resultados da citotoxicidade e da atividade anti-rotavírus (RV-SA11) dos compostos testados através do ensaio do MTT.....	132

Tabela 30: Resultados da citotoxicidade e da atividade anti-herpes (HSV-1 cepa 29R) do composto (98) , através do ensaio do MTT.....	134
Tabela 31: Resultados da triagem da potencial atividade antiviral das sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona (22 a 30) (100 µM) e das sulfonamidas derivadas da quinolina (38 a 48) (100 µM), através do método de redução de formação de placas de lise.....	143
Tabela 32: Resultados da citotoxicidade e da atividade anti-HSV-2 das sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona e das sulfonamidas derivadas da quinolina, através do ensaio do MTS e do método de redução de formação de placa de lise, respectivamente	144
Tabela 33: Resultados da triagem da potencial atividade antiviral dos oligossacarídeos e polissacarídeos sulfatados (100 µg/ml), através do método de redução de formação de placa de lise.....	145
Tabela 34: Resultados da triagem da potencial atividade antiviral dos oligossacarídeos e polissacarídeos sulfatados (100 µg/ml), através do método de redução de formação de placa de lise.....	146
Tabela 35: Resultados da triagem da potencial atividade antiviral dos derivados de lactose sulfatados (100 µg/ml), através do método de redução de formação de placa de lise.....	146
Tabela 36: Resultados da triagem da potencial atividade antiviral dos derivados de lactose sulfatados (100 µg/ml), através do método de redução de formação de placa de lise.....	147
Tabela 37: Resultados da citotoxicidade e da atividade antiviral dos derivados de lactose sulfatados e dos derivados do oligossacarídeo celobiose, através do ensaio do MTS e do método de redução de formação de placa de lise, respectivamente	148
Tabela 38: Efeito do composto (167) sobre o tamanho das placas virais das cepas do HSV e das variantes do HSV-1 resistentes ao (167) nas células GMK AH1, através do Método de redução do tamanho das placas virais.....	155
Tabela 39: Efeito do composto (183) sobre o tamanho das placas virais das cepas do HSV e das variantes do HSV-1 resistentes ao (183) nas células GMK AH1, através do Método de redução do tamanho das placas virais.....	155
Tabela 40: Efeito dos compostos (167) e (183) sobre a infecciosidade das cepas do HSV-1 gC negativas parentais e das variantes do	

HSV-1 gC negativas resistentes aos compostos (167) e (183) nas células GMK AH1, através do Método de redução da formação das placas virais.....	156
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Angstroms
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Albumina do Soro Bovino
CCD	Cromatografia em camada delgada
CC ₅₀	Concentração citotóxica a 50%
CE ₅₀	Concentração efetiva a 50%
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CT	Citotóxicos
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
DAB	Diaminobenzeno
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d6	DMSO deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
D ₂ O	Água deuterada
ECP	Efeito citopático viral
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMEM	Eagle's minimal essential medium
FFU	Unidades formadoras de focos
<i>g</i>	Força da gravidade
gB	Glicoproteína B do HSV
gC	Glicoproteína C do HSV
gD	Glicoproteína D do HSV
gE	Glicoproteína E do HSV
GAG	Glicosaminoglicanas
HCISO ₃	Ácido clorossulfônico
HIV	Vírus da Imundeficiência Humana
HSV-1	Herpes Simplex Virus tipo 1
HSV-2	Herpes Simplex Virus tipo 2
Hz	Hertz
ICP	Proteína de célula infectada
IgG	Imunoglobulina G
IS	Índice de seletividade

IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
KBr	Brometo de potássio
Lit.	Literatura
m	Multiplete
MEM	Minimum Essential Medium
MeOH	Metanol
MOI	Multiplicidade de infecção
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-difeniltetrazólio
NT	Não testado
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
p.f.	Ponto de fusão
PFU	Unidades formadoras de placas
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PVDF	Difluoreto de polivinideno
ppm	Parte por milhão
q	Quarteto
QSAR	Relação estrutura-atividade quantitativa
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RNA	Ácido ribonucléico
RSV	Vírus sincicial respiratório
RV-SA11	Rotavírus cepa SA11
s	Singleto
SAR	Relação Estrutura-Atividade
SDS	Dodecil sultato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SI	Sem inibição
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
VORH	Vacina oral de rotavírus humano
δ	Deslocamento químico em ppm

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 QUÍMICA MEDICINAL.....	25
2.2 ALGUNS VÍRUS DE INTERESSE CLÍNICO.....	29
2.2.1 Herpesvírus.....	30
2.2.1.1 Herpes Simplex Virus tipo 1 e 2.....	30
2.2.2 Rotavírus.....	33
2.2.3 Vírus sincicial respiratório.....	34
2.3 FÁRMACOS ANTIVIRAIS.....	36
2.4 COMPOSTOS DE INTERESSE.....	39
2.4.1 Chalconas.....	39
2.4.2 Sulfonamidas.....	42
2.4.3 Quinolinas.....	45
3 OBJETIVOS.....	47
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1 SÍNTESES.....	49
4.1.1 Procedimento geral para a síntese das sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona	49
4.1.2 Procedimento geral para a síntese das sulfonamidas derivadas da quinolona ou quinolina.....	51
4.1.2.1 Procedimento 1 – Síntese do cloreto da quinolona-3-sulfonila (32).....	51
4.1.2.2 Procedimento 2 – Síntese das sulfonamidas derivadas da quinolona utilizando derivados arilaminometilênicos do Ácido de Meldrum.....	52
4.1.2.3 Procedimento 3 – Síntese sulfonamidas derivadas da quinolina utilizando o cloreto da quinolina-8-sulfonila (38 a 48).....	53

4.1.3	Procedimento para a síntese do sulfonatos derivados da 8-hidroxi-quinolina (compostos 49 e 50).....	55
4.1.4	Procedimento para a síntese do composto 2,2-dimetil-5-[(5-metiltio)-1,3,4-tiadiazol-2-ilamino)metileno]-1,3-dioxano-4,6-dione (51).....	55
4.1.5	Diferentes classes de compostos sintéticos utilizados nos testes de triagem da potencial atividade antiviral.....	55
4.2	AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	64
4.2.1	Preparação das soluções-estoques.....	64
4.2.2	Culturas Celulares.....	64
4.2.3	Vírus.....	65
4.2.4	Preparação das suspensões–estoque virais.....	65
4.2.4.1	HSV-1 e HSV-2.....	65
4.2.4.2	Rotavírus SA 11.....	66
4.2.4.3	Vírus Sincicial Respiratório A-2.....	67
4.2.5	Determinação do título viral.....	67
4.2.5.1	Titulação dos HSV.....	68
4.2.5.2	Titulação do rotavírus SA11	69
4.2.5.3	Titulação do RSV.....	70
4.2.6	Triagem da potencial atividade antiviral realizado no Laboratório de Virologia Aplicada/UFSC.....	71
4.2.6.1	Avaliação da citotoxicidade, através do ensaio do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-difeniltetrazólio].....	71
4.2.6.2	Avaliação da potencial atividade antiviral, através do ensaio do MTT.....	73
4.2.7	Triagem da potencial atividade realizado no Departamento de Virologia Clínica da Universidade de Göteborg Suécia.....	74
4.2.7.1	Avaliação da potencial atividade antiviral, através do método de redução de formação de placa de lise (NYBERG et al., 2004).....	76
4.2.8	Determinação da concentração citotóxica a 50% (CC ₅₀).....	76
4.2.9	Determinação da concentração efetiva a 50% (CE ₅₀).....	77

4.2.10	Ação virucida (EKBLAD et al., 2006).....	79
4.2.11	Estudo do mecanismo de ação antiviral.....	79
4.2.11.1	Efeito do tempo de adição dos compostos no ciclo de replicação do HSV-1 cepa 29R/resistente ao aciclovir.....	79
4.2.11.2	Avaliação da expressão das proteínas virais....	81
4.2.11.3	PCR em Tempo Real com sonda TaqMan®:....	83
4.2.11.4	Efeito do composto-teste sobre a dispersão dos vírus célula-célula.....	84
4.2.11.5	Avaliação da inibição dos receptores celulares.	87
4.2.11.6	Preparação e avaliação da sensibilidade das variantes do HSV resistentes ao composto	94
4.2.12	Análise Estatística.....	96
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.	97
5.1	SÍNTESE.....	97
5.1.1	Caracterização dos compostos	97
5.1.2	Sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona.....	109
5.1.3	Sulfonamidas derivadas da quinolona e da quinolina.....	113
5.1.4	Sulfonatos derivados da 8-hidroxi-quinolina.....	121
5.1.5	Síntese orgânica e atividade antiviral	123
5.2	AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	123
5.2.1	Determinação dos títulos virais.....	124
5.2.2	Triagem da potencial atividade antiviral realizado no Laboratório de Virologia Aplicada/UFSC	125
5.2.2.1	Potencial atividade anti-rotavírus.....	131
5.2.2.2	Potencial atividade anti-herpética.....	132
5.2.2.3	Estudo do mecanismo de ação antiviral do composto (98).....	136
5.2.3	Triagem da potencial atividade antiviral realizada no Departamento de Virologia Clínica da Universidade de Göteborg/Suécia.....	142
5.2.3.1	Sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona e sulfonamidas derivadas da sulfonamida.....	142

5.2.3.2	Oligossacarídeos e Polissacarídeos sulfatados	144
5.3	AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE LEISHMANICIDA DAS SULFONAMIDAS DERIVADAS DA 4-METOXICHALCONA.....	158
6	CONCLUSÕES	160
	REFERÊNCIAS	163

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa de novos fármacos passou por significativos avanços nos últimos anos, principalmente depois da introdução de modelos biológicos realizados *in vitro* e em grande escala, os quais podem avaliar várias amostras, em um curto período de tempo, permitindo a realização de várias repetições dos experimentos e propiciando uma análise estatística consistente dos resultados. Os avanços tecnológicos que contribuem para a busca de novos compostos incluem a descoberta de novos alvos moleculares, impulsionada pelas novas ferramentas de biologia molecular, e a evolução de novas técnicas de síntese orgânica, gerando substâncias ativas mais potentes e/ou menos tóxicas, que podem ser utilizadas como compostos-modelos de fármacos com atividades farmacológicas semelhantes às originais (NIELSEN, 2002; NEWMAN; CRAGG, 2003).

Os fármacos usados clinicamente são desenvolvidos a partir dos chamados compostos-modelos, que eram inicialmente descobertos investigando-se os produtos naturais, produzidos por plantas, fungos, bactérias, organismos marinhos entre outros (SILVERMAN, 1992; THOMAS, 2003). A biodiversidade já se mostrou como a principal fonte de matéria-prima conhecida e estudada, porém, a demanda por medicamentos mais efetivos para novas e antigas patologias, associada ao desenvolvimento da síntese em química orgânica levou ao aumento da produção de compostos sintéticos (CORREA, 1997).

Freqüentemente, os compostos-modelos não são adequados para o uso clínico, pois apresentam a atividade farmacológica desejada, mas podem ter outras características indesejáveis, como alta toxicidade, outras atividades farmacológicas e insolubilidade. No entanto, suas estruturas servem como ponto inicial para a síntese dos chamados análogos, através dos quais se busca amplificar a atividade desejada e/ou eliminar as propriedades indesejadas (SILVERMAN, 1992). Uma vez identificados, esses compostos-modelos são submetidos a um desenvolvimento adicional, incluindo o uso de Relações Estrutura-Atividade (SAR), Relações Estrutura-Atividade Quantitativas (QSAR), química combinatória e modelagem molecular de fármacos (BARREIRO; FRAGA, 2001; THOMAS, 2003).

A literatura científica relata diversas classes de compostos orgânicos com

efeitos farmacológicos promissores e um crescimento significativo no aparecimento de novas moléculas com potência similar ou superior à dos fármacos disponíveis. Entre estes compostos, estão as sulfonamidas, as chalconas e as quinolinas. Alguns desses compostos já se encontram em uso na terapêutica, por exemplo, as sulfonamidas (DREW, 2000; KECSKEMETI et al., 2002; SUPURAN; CASINI; SCOZZAFAVA, 2003; PETERSEN, 2004) e outros, como as chalconas (DIMMOCK et al., 1999; UCHIUMI et al., 2003; KROMANN et al., 2004) e as quinolinas (BRIDEAU et al., 2002; THOMSEN et al., 2003; HARTLINE, et al., 2005) emergem como possíveis candidatos a novos fármacos.

Númerosas técnicas e estratégias têm sido testadas e consideráveis esforços são gastos na pesquisa de novas gerações de terapias antivirais (KLEYMANN, 2003). Entretanto, apesar de quase 50 anos de pesquisa, o arsenal de fármacos antivirais permanece pequeno (FLINT et al., 2000), compreendendo em torno de 40 fármacos (DE CLERCQ, 2004a). Muitos desses fármacos apresentam graves restrições de uso, tais como reduzido espectro de atividade, utilidade terapêutica limitada, vários graus de toxicidade (SIMÕES et al., 1999), baixa biodisponibilidade oral (DE CLERCQ, 2003) e o desenvolvimento de resistência aos medicamentos antivirais disponíveis (DE CLERCQ, 2004b).

Apesar do grande avanço científico e tecnológico na área de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antivirais, assim como no conhecimento molecular das doenças virais, poucos fármacos vêm sendo aprovados pelas autoridades governamentais para uso clínico.

Diante destes fatos, o desafio de obter novos medicamentos, a partir de produtos naturais ou sintéticos, para o tratamento de doenças infecciosas, como as doenças virais, permanece atual. Assim, a continuidade e a ampliação dos estudos nessas áreas poderão contribuir para a solução destes problemas.

Com o intuito de contribuir para a pesquisa de novos fármacos antivirais, o presente trabalho teve como objetivo a síntese e a avaliação da potencial atividade antiviral de diferentes classes de compostos sintéticos, assim como o estudo dos mecanismos de ação envolvidos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUÍMICA MEDICINAL

A química medicinal, dentre suas inúmeras atribuições, inclui o planejamento racional de novas substâncias bioativas, envolvendo a síntese ou a modificação molecular de substâncias; o isolamento e a elucidação estrutural de substâncias ativas naturais; a descrição de moléculas desde a sua constituição atômica (passando por relações entre suas estruturas e suas propriedades) até suas características estruturais, quando da(s) interação(ões) com os diferentes sistemas biológicos; e a compreensão em nível molecular de processos bioquímicos, farmacológicos e toxicológicos. E, finalmente a proposição e a validação de modelos matemáticos, através dos estudos de relações entre as estruturas químicas e as atividades farmacológicas e/ou toxicológicas detectadas, permitindo então a síntese de novas entidades de interesse (AMARAL; MONTANARI, 2002).

O desenvolvimento e o sucesso da química medicinal requerem o conhecimento e a aplicação de estratégias metodológicas híbridas, no âmbito de um grande espaço inter-, trans- e multidisciplinar, fundamentados em inúmeros conhecimentos, como por exemplo, de biofísica, biologia molecular, bioquímica, estatística, físico-química, fisiologia, matemática, patologia, química biológica, inorgânica, orgânica e quântica (MONTANARI, 2000).

A descoberta de um novo fármaco depende em parte da investigação estrutural e ainda do fator sorte, assim grande parte dos fármacos disponíveis no mercado foram desenvolvidos através de uma mistura de planejamento racional, tentativa e erro, trabalho extensivo e sorte (PATRICK, 2001; THOMAS, 2003).

No desenvolvimento de novos fármacos, existem dois métodos genéricos para identificar um composto-modelo, que será utilizado na pesquisa de futuros análogos:

1 - Programas de triagem:

O composto-modelo pode ser identificado por programas de triagem, através da avaliação da atividade farmacológica de interesse, utilizando bioensaios *in vitro* adequados. Sendo esse um método empírico, o alvo molecular para os fármacos não foi previamente definido (NEWELL, 2005).

Os programas de triagem aleatória, nos quais todos os materiais disponíveis são testados, a despeito de suas estruturas, foram usados extensivamente para identificar compostos-modelos. As duas maiores classes de materiais avaliados são os compostos sintéticos e os produtos naturais. Esses métodos ainda são empregados, mas o uso de procedimentos de varredura mais focalizados são mais comuns, nos quais tipos estruturais específicos são testados (THOMAS, 2003).

Quando um programa de triagem identifica compostos com atividade farmacológica de interesse, o composto mais promissor responsável por esta atividade é usado como um modelo para a produção de análogos e esses, por sua vez, são submetidos a um novo procedimento de triagem. Esta seqüência de triagem seletiva e de síntese de análogos pode ser repetida muitas vezes antes que um fármaco potencialmente útil seja encontrado (THOMAS, 2003).

2 - Planejamento racional baseado no mecanismo de ação:

A estratégia de desenho ou planejamento da arquitetura molecular de substâncias bioativas candidatas a novos fármacos, baseada no mecanismo de ação farmacológica, fundamenta-se no prévio conhecimento do processo fisiopatológico envolvido e na escolha do melhor alvo-terapêutico (NEWELL, 2005). Este alvo, representado por uma biomacromolécula – enzima ou receptor, propriamente dito - pode ter sua estrutura molecular conhecida ou não. No primeiro caso, o conhecimento da topografia molecular tridimensional do receptor, particularmente do sítio de interação, permite o desenho de inibidores enzimáticos ou de compostos antagonistas/agonistas dos receptores, por processos de complementaridade molecular planejada, que podem, por sua vez discriminar entre interações reversíveis ou ligações covalentes. Neste processo se identifica um novo bioligante, com propriedades estruturais adequadas ao reconhecimento molecular pelo biorreceptor, reflexo de suas propriedades farmacodinâmicas. Em contraste, a estrutura do biorreceptor eleito como alvo terapêutico para o novo fármaco pode não ser conhecida, neste caso, o desenho molecular do inibidor ou do antagonista/agonista dos receptores inicia-se pela estrutura da micromolécula endógena envolvida na fisiopatologia do processo em estudo, ou seja, do substrato enzimático ou do agonista do receptor eleito como alvo terapêutico (BARREIRO; FRAGA, 2001).

Os compostos-modelos, identificados por uma das metodologias descritas

acima, deverão apresentar a atividade farmacológica desejada, e o nível de atividade poderá não ser muito grande e/ou apresentar efeitos indesejáveis. Entretanto, esses compostos-modelos com atividade farmacológica poderão ser usados como um ponto de partida para o desenvolvimento de um novo fármaco, através da síntese de análogos estruturais e da avaliação da atividade farmacológica e da segurança dos mesmos (PATRICK, 2001).

Os compostos-modelos identificados poderão ter sua eficácia otimizada por modificações moleculares subseqüentes, planejadas de maneira a preservar as propriedades farmacodinâmicas identificadas nos ensaios.

As relações estrutura-atividade (SAR) são determinadas fazendo-se pequenas alterações na estrutura do composto-modelo, seguidas da avaliação do efeito sobre a atividade e a potência dos análogos resultantes. Estas alterações podem ser realizadas através da alteração no tamanho e na conformação do esqueleto de carbono, pela introdução de novos substituintes e através da estereoquímica do composto-modelo. Os estudos de SAR de um composto-modelo e seus análogos podem ser usados para determinar as partes da estrutura do composto-modelo responsáveis por sua atividade farmacológica, isto é, seu grupo farmacofórico e, também, por seus efeitos indesejáveis. Esta informação é usada para desenvolver um novo fármaco com atividade aumentada ou com menores efeitos indesejáveis (PATRICK, 2001; ANDRICOPULO; MONTANARI, 2005).

As relações estrutura-atividade quantitativas (QSAR) estabelecem uma relação matemática, sob a forma de uma equação que relaciona a atividade farmacológica e os parâmetros físico-químicos mensuráveis, que representam propriedades tais como, lipofilicidade, efeitos eletrônicos e estéricos, com grande influência sobre a atividade do fármaco. Estas propriedades podem ser calculadas utilizando-se programas específicos ou podem ser obtidas experimentalmente. Os parâmetros comumente usados para representar estas propriedades são os coeficientes de partição para a lipofilicidade e as constantes de σ de Hammett para os efeitos eletrônicos (THOMAS, 2003; YANG; HUANG, 2006).

Os estudos clássicos de QSAR são feitos usando-se dados estruturais moleculares derivados da representação bidimensional (2D) da molécula, tais como log P e refratividade molar. A rápida acumulação de informações experimentais de

estruturas tridimensionais (3D) para muitas moléculas orgânicas de interesse farmacológico contribui para o desenvolvimento de métodos rápidos e precisos para geração de estruturas 3D e alinhamento, conduzindo ao desenvolvimento de descritores 3D e as relações estrutura-atividade quantitativas tridimensionais (QSAR-3D). Todos os métodos de QSAR-3D combinam modelagem molecular e análise estatística da potência biológica em estudo dentro de um conjunto de compostos (WALTER, 2004).

O desenvolvimento da química combinatória tem proporcionado uma rápida criação de enormes bibliotecas de novas moléculas, com o objetivo de aumentar a probabilidade de se encontrar moléculas interessantes e de identificar compostos-modelo com a atividade farmacológica desejada (KUBINYI, 1998). Este grande número de compostos-protótipos é submetido a um processo de triagem de alta demanda (high-throughput screening – HTS), na qual a automatização e a robotização dos ensaios biológicos permitem que um único usuário examine dezenas de milhares de compostos por dia. Os métodos de triagem de alta demanda geram resultados acurados, mesmo quando estão disponíveis quantidades extremamente pequenas das substâncias testadas (BONE; SALEMME, 1997).

A química combinatória pode, assim, ser usada para identificar novas classes de compostos-protótipos, para realizar estudos de SAR e para determinar quais membros de uma série de análogos possuem atividades farmacológicas (BONE; SALEMME, 1997).

A modelagem molecular pode ser considerada como uma técnica computacional baseada nos métodos de química teórica e dados experimentais, que podem ser utilizados para analisar moléculas e sistemas moleculares, ou prever propriedades moleculares e farmacológicas. Podem fornecer, ainda, informações sobre a afinidade de um fármaco por um dado receptor e os tipos de ligações que possam estar envolvidas na formação do complexo fármaco-receptor (THOMAS, 2003).

De forma geral, a aplicação da modelagem molecular na química medicinal vem seguindo abordagens "estáticas" centradas, principalmente, nos ligantes (fármacos, compostos-modelo, etc), sendo exemplos clássicos a SAR e a QSAR. Estas estratégias de construção de modelos em química computacional sem a consideração direta das proteínas-alvo foram delimitadas, tanto pela pequena

disponibilidade de estruturas 3D de receptores, quanto pelo elevado custo computacional necessário para se gerar relações quantitativas entre a estrutura e a atividade farmacológica, utilizando-se modelos dinâmicos. Este quadro vem se modificando com a ampliação do número de trabalhos que utilizam outros tipos de metodologias capazes de produzir modelos "dinâmicos" do complexo entre o ligante e sua proteína-alvo. Dentre estas pode-se citar a QSAR-4D, a dinâmica molecular e o método de Monte Carlo (VERLI; BARREIRO, 2005).

2.2 ALGUNS VÍRUS DE INTERESSE CLÍNICO

Vírus são agentes infecciosos que necessitam da atividade metabólica e das organelas da célula hospedeira para produção de energia e síntese de macromoléculas, ou seja, para sua multiplicação (TORTORA et al., 2005). Eles contêm apenas um tipo de material genético. Essas entidades infecciosas consistem de um genoma DNA ou RNA, acondicionado num capsídeo protéico, que pode ou não ser circundado por uma membrana lipídica herdada das células hospedeiras, o envelope. O material nucléico recoberto por proteína é denominado nucleocapsídeo. O termo vírion serve para designar partículas virais completas, potencialmente infecciosas, formadas na última fase da replicação viral. O capsídeo é composto por um número definido de unidades morfológicas, os capsômeros. A montagem dos vírus é definida pela natureza das ligações formadas entre os capsômeros individuais, o que confere a simetria do capsídeo, podendo esta ser helicoidal, icosaédrica ou mista (VOYLES, 1993).

Os vírus são capazes de reconhecer e de penetrar em células-alvo, principalmente, pela especificidade dos receptores na superfície dessas células hospedeiras e dos próprios vírus (SPEAR, 2004). O conjunto de eventos que vão desde a penetração do genoma viral na célula até a liberação dos vírions é chamado de ciclo de multiplicação viral. A maneira como o vírus se multiplica é determinada pela estrutura do genoma: se DNA ou RNA; se RNA positivo (+) ou negativo (-) e da estrutura do próprio vírion a ser replicado. As principais etapas da multiplicação viral podem ser resumidas numa fase inicial, com fixação do vírus à célula hospedeira, penetração e desnudamento (decapsidação) da partícula viral, e numa fase tardia, que vai desde a síntese macromolecular até a montagem e liberação dos vírions (WHITE; FENNER, 1994).

2.2.1 Herpesvírus

Os herpesvírus são altamente disseminados na natureza. Aproximadamente 100 vírus da família Herpesviridae foram caracterizados, sendo que existem oito vírus herpéticos que infectam humanos (Quadro 1). Além disso, o vírus herpético B de macacos pode também infectar o homem causando uma forma de encefalite mortal (DA SILVA, 2000).

Ao contrário da maioria das outras famílias de vírus, os herpesvírus podem causar infecções líticas e latentes. A infecção latente com subsequente doença recorrente é uma de suas características (ROIZMAN; KNIPE, 2001).

2.2.1.1 Herpes Simplex Vírus tipos 1 e 2

O Herpes Simplex Virus tipos 1 e 2 pertencem à subfamília Alphaherpesvirinae caracterizando-se por uma faixa variável de hospedeiros, ciclos reprodutivos relativamente curtos, disseminação rápida em células de cultura, lise das células infectadas e estabelecimento de infecções latentes, primariamente em gânglios nervosos sensoriais. O fato de o próprio vírus herpético codificar as principais enzimas necessárias à replicação do DNA viral, mantendo um grau de virulência suficiente para não ser subjugado pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, faz com que sua sobrevivência em células neurais (permanentes), que não replicam DNA e não se dividem, seja viabilizada (WHITE; FENNER, 1994; LUPI; PEREIRA JR., 2000).

O HSV-1 e o HSV-2 apresentam o genoma igual e 83% de homologia nas regiões que codificam as proteínas virais, podendo ser distinguidos sorologicamente (GUPTA et al., 2007). O HSV é composto de um cerne contendo DNA linear, de fita dupla, associado às proteínas do core, ancorado por fibrilas à um capsídeo icosaédrico de 100 nm de diâmetro composto de 162 capsômeros (150 hexâmeros e 12 pentâmeros) e de um envelope lipoprotéico de 120-200 nm com numerosos peplômeros glicoprotéicos. Seu genoma é um dos maiores genomas virais de herpesvírus humanos, codificando cerca de 70 a 200 proteínas (WHITE; FENNER, 1994).

Quadro 1: Tipos de herpesvírus humanos.

Subfamília	Nome oficial	Nome Comum	Sigla
Alfaherpesvirinae	Herpesvírus humano-1	Herpes simplex vírus tipo 1	HSV-1
	Herpesvírus humano-2	Herpes simplex vírus tipo 2	HSV-2
	Herpesvírus humano-3	Vírus da varicela zoster	VZV
Betaherpesvirinae	Herpesvírus humano-5	Citomegalovírus	CMV
	Herpesvírus humano-6	Vírus herpes humano tipo 6	HHV-6
	Herpesvírus humano-7	Vírus herpes humano tipo 7	HHV-7
Gamaherpesvirinae	Herpesvírus humano-4	Vírus Epstein-Barr	EBV
	Herpesvírus humano-8	Vírus herpes humano tipo 8	HHV-8

Fonte: modificado de DA SILVA (2000)

Na primo-infecção pelos herpesvírus, o vírus penetra no corpo por invasão das mucosas ou soluções de continuidade da pele. O vírus sofre, então, replicação nas células situadas na base do sítio de entrada, podendo ou não produzir lesões vesiculares (WHITLEY; ROIZMAN, 2001). Após, o vírus dissemina-se para células nervosas adjacentes. Nos neurônios, o nucleocapsídeo é encaminhado para o núcleo, iniciando a infecção latente. Nesta fase, o genoma viral está reprimido e parcialmente integrado ao DNA da célula, sendo que apenas algumas regiões específicas do genoma viral são transcritas, as chamadas regiões LAT. O vírus pode então ser ativado por vários estímulos, como estresse, febre, trauma, mudanças hormonais, radiação ultravioleta, etc, e depois passar retrogradamente pelo nervo, causando lesões características em sítios específicos da pele e mucosas, principalmente no local da infecção primária (LUPI; PEREIRA JR., 2000). Após o estabelecimento da latência, a recorrência do HSV é conhecida com infecção recorrente (FIELDS et al., 2001). Durante o período da latência herpética, os vírus são inacessíveis ao sistema imune e aos medicamentos atualmente disponíveis (ROIZMAN; KNIPE, 2001).

Após a recuperação da infecção primária, o indivíduo retém por toda a vida o DNA herpético no gânglio trigêmio para o HSV-1 e nos gânglios sacrais próximo a

coluna para o HSV-2, com no mínimo 50% de chances de sofrer ataques recorrentes de herpes labial ou genital, respectivamente, várias vezes no decorrer da sua existência (FIELDS et al., 2001). Em pacientes imunocomprometidos (submetidos à transplantes, quimioterapia anticâncer e portadores de AIDS), as infecções latentes são freqüentemente reativadas (WHITE; FENNER, 1994).

Os vírus HSV-1 e HSV-2 são importantes patógenos que infectam um grande número de pessoas no mundo todo. Os sintomas da doença não são sempre aparentes, mesmo durante a infecção primária, e podem variar desde lesões cutâneas e de mucosas até encefalites ou doenças sistêmicas envolvendo múltiplos órgãos (EKBLAD, 2007). Em indivíduos imunocomprometidos, incluindo pacientes com AIDS e transplantados, as reativações virais são usualmente mais freqüentes e sintomáticas, podendo causar uma doença disseminada, afetando vários órgãos incluindo o fígado, os pulmões e o cérebro. Esta forma de doença esta associada com alta mortalidade/morbidade dos indivíduos afetados (LEVIN et al., 2004). Além da gravidade e da cronicidade da doença, é comum o relato de isolamento de amostras resistentes ao aciclovir, o primeiro fármaco de escolha para o tratamento das infecções causadas pelo HSV (VARELLA et al. 2005).

Embora as infecções pelos vírus HSV-1 e o HSV-2 sejam, geralmente, transmitidas por vias diferentes e envolverem diferentes áreas do corpo, ambos vírus podem causar infecções clinicamente indistinguíveis em vários locais e podem permanecer latentes no gânglio sensorial, o qual pode ser reativado em infecções recorrentes sintomáticas ou assintomáticas (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

O HSV-1 está associado principalmente a infecções orais, enquanto que o HSV-2 a infecções genitais. Entretanto, devido ao contato orogenital, o HSV-1 é responsável por 10 a 20% das lesões genitais e sua incidência nesse local tem aumentado. Até dois terços da população sexualmente ativa têm herpes assintomático, e a maioria dissemina o vírus durante os períodos de latência. Mais preocupante é a prevalência do HSV-2 que quintuplicou em adolescentes e dobrou em adultos jovens durante as duas últimas décadas (NADAL; NADAL, 2007).

A transmissão do HSV ocorre, geralmente, por contato direto com as lesões ou secreções corporais infectadas. O HSV-1 freqüentemente é adquirido durante a infância e a soroprevalência é inversamente relacionada com as condições socio-econômicas (ARDUINO; PORTER, 2008). Este vírus apresenta distribuição

universal alcançando uma soroprevalência em 70% dos adultos nos países desenvolvidos e aproximadamente 100% em países em desenvolvimento (GUPTA et al., 2007). O HSV-2 é transmitido, principalmente, por contato sexual. A prevalência do HSV-2 inicia com o aumento da atividade sexual na adolescência, aumentando progressivamente durante a idade adulta. A soroprevalência do HSV-2 aumenta de 20-30% na idade entre 15-29 anos para 35-60% aos 60 anos. A infecção por HSV também pode ser adquirida *in utero*, durante o parto normal ou após o nascimento, resultando em infecções disseminadas em complicações no sistema nervoso central (WHITLEY; ROIZMAN, 2001; GUPTA et al., 2007).

O HSV-2 causa, principalmente, o herpes genital, que é uma das doenças sexualmente transmissíveis de maior prevalência no mundo. Além disso, ao longo das últimas duas décadas as infecções pelo HSV-2 têm sido associadas a um risco três vezes maior de adquirir sexualmente o HIV. As perturbações na mucosa causadas pelas úlceras genitais favorece as infecções pelo HIV por fornecer uma porta de entrada. Assim como, a reativação do HSV-2 resulta no recrutamento de células do sistema imune para as mucosas afetadas, acarretando em uma maior disponibilidade das células-alvo do vírus HIV (GUPTA et al., 2007).

2.2.2 Rotavírus

Os rotavírus são classificados como um gênero da família Reoviridae. Os vírions apresentam morfologia esférica com simetria icosaédrica, não-envelopados, e possuem cerca de 72 nm de diâmetro. O genoma é constituído de RNA dupla-fita, consistindo de 11 segmentos separados, que possuem de 18 a 27 kb no total. Cada segmento representa um gene que codifica uma proteína, seja ela estrutural ou não-estrutural. A partícula viral é uma estrutura tripla, formada por capsídeo duplo, um externo e outro interno, formados por proteínas distintas, e por um núcleo mais interno que envolve o RNA viral. As proteínas estruturais são denominadas VP e numeradas de 1 a 7, de acordo com o gene pelo qual cada uma é codificada. A proteína VP7 (codificada pelo gene 7, 8 ou 9, dependendo da cepa viral) é glicosilada e forma o capsídeo externo, que é penetrado por mais de 60 espículas da proteína VP4 (codificada pelo gene 4), que é hemaglutinante e responsável pelo ataque do vírus à célula. Para poder penetrar na célula, ocorre a clivagem de VP4 em VP5 e VP8 pela tripsina. A proteína VP6 forma o capsídeo interno. O núcleo

interno é composto pelas proteínas VP1, VP2 e VP3 (codificadas pelos genes 1, 2, 3, respectivamente) (WHITE; FENNER, 1994).

Até o momento, foram identificados sete sorogrupos de rotavírus definidos de acordo com a antigenicidade da proteína VP6, e nomeados de A a G, mas somente três são infectantes para o homem (A, B e C). Os rotavírus do grupo A podem ainda ser subdivididos, de acordo com a antigenicidade de VP6, em subgrupos I e II. Os rotavírus do grupo A são freqüentemente identificados como o mais importante patógeno viral em doenças diarréicas, que requerem tratamento ou hospitalização de crianças abaixo de 2 anos de idade, e são os maiores responsáveis por diarreias severas em crianças no mundo todo (WHITE; FENNER, 1994; TAKAHASHI et al., 2001).

A via de contaminação é fecal-oral e o período de incubação é cerca de 48 h. Os sintomas são gastroenterite com vômitos, diarreia aquosa e febre. Em pacientes imunocomprometidos, os rotavírus podem causar várias complicações associadas à diarreia, tais como desidratação, desequilíbrio eletrolítico, acidose, sintomas neurológicos e infecção persistente com grande envolvimento de todo o organismo (GILGER, et al., 1992).

O rotavírus causa anualmente aproximadamente 111 milhões de eventos de diarreia que não demandam consulta médica, 25 milhões de consultas médicas e 2 milhões de hospitalizações. Com base nas informações sobre mortalidade por diarreia aguda estima-se que esta infecção causará aproximadamente 440.000 mortes anuais (PARASHAR et al., 2003). Embora os casos de diarreia por rotavírus se concentrem em crianças de países em desenvolvimento, esse vírus distribui-se universalmente, infectando todas as crianças no mundo independentemente de sua classe social (VRANJAC, 2004).

2.2.3 Vírus sincicial respiratório

O Vírus sincicial respiratório (RSV) pertence ao gênero *Pneumovirus* da família Paramyxoviridae (SIDWELL; BARNARD. 2006). Seu vírion é composto de um nucleocapsídeo envelopado de simetria helicoidal, com diâmetro variável entre 12 e 15 nm. O seu envelope consiste de dupla camada lipídica que tem origem na membrana citoplasmática da célula hospedeira. O genoma viral é composto de RNA

fita simples não segmentada de polaridade negativa (FIELDS et al., 2001). Por não ser segmentado o vírus não tem a mesma capacidade de recombinação dos segmentos genômicos que o vírus da influenza, na qual ocorrem os deslocamentos antigênicos, responsáveis pelas pandemias. Contudo, como todos os vírus RNAs, o RSV tem a capacidade de pequenas mutações genômicas, devido a dependência da RNA polimerase que perde a capacidade de correção e edição (REIS, 2006).

O genoma viral apresenta 15 kb e codifica pelo menos onze proteínas, oito das quais compreendem o vírion (SIDWELL; BARNARD, 2006). O genoma do RSV possui cerca de 10 genes que codificam estas 11 proteínas. As proteínas não estruturais são designadas NS1 e NS2. Dentre as estruturais, três são glicoproteínas de membrana (G, F e SH), duas presentes na matriz do vírus conhecidas por M e M2-1, três estão associadas ao RNA genômico para formar o nucleocapsídeo viral (N, P e L) e uma é regulatória (M2-2) (FIELDS et al., 2001).

O RSV é o principal agente de infecções respiratórias agudas que acomete o trato respiratório inferior em crianças menores de um ano de idade, sendo responsável por alta mortalidade e morbidade (LEUNG et al., 2005). O vírus RSV também é uma significativa causa de infecções respiratórias entre as pessoas idosas, em pacientes com doenças cardiorespiratória e imunocomprometidos (FALSEY; WALSH 2000; FALSEY; WALSH 2006).

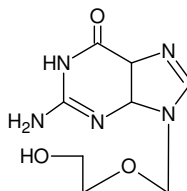
Os principais fatores de risco para maior gravidade da infecção por RSV são prematuridade, doenças cardiopulmonares e imunossupressão. Nestes pacientes, há maior risco que o RSV acometa o trato respiratório inferior, evoluindo com maior gravidade, e com a necessidade de hospitalização para tratamento, muitas vezes em unidades de terapia intensiva. Em certos pacientes, a mortalidade pode ser muito elevada, como observado em pacientes submetidos a transplante de medula óssea, nos quais a mortalidade por pneumonia por RSV pode chegar a 80% (FARHAT et al., 2002; EBBERT; LIMPER, 2005).

O RSV é um dos principais agentes etiológicos de infecções respiratórias no primeiro ano de vida, causando desde quadros leves como resfriados, até bronquiolite e pneumonia, com insuficiência respiratória aguda. Lactentes menores de 6 meses de idade, principalmente os prematuros com menos de 35 semanas de idade gestacional, aqueles com doença pulmonar crônica da prematuridade (displasia broncopulmonar) e cardiopatas são a população de maior risco para desenvolver as formas mais graves da doença (FARHAT et al., 2002).

A epidemiologia do RSV é bem conhecida. A frequência de infecção por RSV chega a 70% no primeiro ano de vida, e praticamente todas as crianças acima de dois anos de idade já tiveram contato com este vírus. Aproximadamente 30 a 40% das infecções primárias por RSV acometem o trato respiratório inferior, com taxa de hospitalização de uma em cada 100 crianças infectadas. A reinfecção por RSV é freqüente, no entanto, os episódios subseqüentes costumam ser menos severos (FARHAT et al., 2002).

2.3 FÁRMACOS ANTIVIRAIS

As terapias disponíveis para os herpes simplex vírus consistem principalmente de inibidores da polimerase, incluindo aciclovir (1), valaciclovir, penciclovir, famciclovir, preferencialmente para infecções causadas pelos vírus herpéticos dos tipos 1 e 2. Esses fármacos têm como alvo a DNA-polimerase viral, podendo ser classificados em duas classes químicas: análogos de nucleosídeos e análogos do pirofosfato (DE CLERCQ, 2004b).



(1)

Os análogos de nucleosídeos são substratos para a polimerase viral. A atividade antiviral dos análogos de nucleosídeos depende da conversão metabólica para sua respectiva forma tri-fosfato, via três eventos distintos de fosforilação: o primeiro, que é catalizado pela fosfotransferase viral, e os outros dois, que são catalizados pelas enzimas celulares. A incorporação do análogo de nucleosídeos na cadeia do DNA nascente bloqueia a elongação do DNA. Alguns destes fármacos apresentam importantes efeitos colaterais e baixa biodisponibilidade. A administração oral dos fármacos aciclovir e penciclovir na forma de pró-fármacos valaciclovir e famciclovir, respectivamente, resultou em maiores níveis plasmáticos e aumento da biodisponibilidade do fármaco ativo (VISALLI; VAN ZEIJL, 2003).

Uma alternativa terapêutica clinicamente disponível é o foscarnet (ácido fosfonofórmico), análogo do pirofosfato, que inibe diretamente a DNA polimerase viral. Esse composto é usado freqüentemente como segunda escolha quando é

verificada resistência aos análogos dos nucleosídeos, apesar de sua baixa biodisponibilidade e alta toxicidade (DE CLERCQ, 2004b).

O aciclovir é o fármaco de escolha no tratamento do HSV-1 e do HSV-2, 100 vezes mais seletivo para a DNA polimerase viral do que para a DNA polimerase celular, possuindo, desta forma, baixa toxicidade. O aciclovir não elimina o vírus do hospedeiro e deve ser usado nas recidivas (CASSADY; WHITLEY, 1997). A resistência dos herpesvírus ao aciclovir não é uma questão recente, mas a disseminação de cepas resistentes em pacientes imunocomprometidos e a decorrente progressão da doença são preocupantes. A resistência pode ser devido à expressão reduzida da timidina quinase viral nessas cepas, ou à existência de uma timidina quinase não funcional, além de timidina quinases mutantes capazes de selecionar o substrato nucleosídico do aciclovir. O desenvolvimento da resistência pode estar relacionado com o uso de altas doses terapêuticas ou profiláticas do aciclovir associado à imunossupressão (BRADY et al., 2004).

O desenvolvimento de resistência dos HSV aos fármacos antivirais usados na clínica ou em ensaios de laboratório é um fenômeno bem conhecido. As variantes do HSV resistentes aos análogos de nucleosídeos são encontradas e em aproximadamente 0,1-0,7% das amostras obtidas de pacientes imunocompetentes e em 4-7% em amostras de pacientes imunodeprimidos. Um longo tempo de replicação na presença dos vírus é usualmente requerido para a seleção/geração das variantes resistentes com mudanças adaptativas em seu genoma. Pacientes imunocomprometidos usualmente sofrem de freqüentes e prolongados períodos de ativa replicação viral, assim o tratamento contínuo destes indivíduos pode levar a seleção de variantes resistentes aos fármacos (LEVIN et al., 2005).

Embora exista algum tipo de terapia para muitos dos herpesvírus que infectam humanos, as limitações devido à especificidade, biodisponibilidade, toxicidade (VISALI; VAN ZEIJL, 2003) e/ou o desenvolvimento de resistência (GRECO et al., 2007) justificam a busca e o desenvolvimento de novos e melhores fármacos antivirais.

No Brasil foi introduzida, em 2006, a vacina oral de rotavírus (VORH) no Calendário Básico de Imunizações para crianças. A VORH é uma vacina elaborada com vírus isolados de humanos e atenuados para manter a capacidade imunogênica, porém não patogênica. A vacina é monovalente, ou seja, a cepa

utilizada possui apenas um sorotipo em sua composição que é o G1[P8] da cepa RIX4414 (Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2006).

O tratamento da infecção por rotavírus consiste em tratar os sintomas clínicos, como a diarreia e o vômito, administrando-se eletrólitos ao paciente, por via oral ou venosa. Entretanto, em casos severos e em pacientes imunocomprometidos, que estão sofrendo de diarreia prolongada e febre, um tratamento específico contra o vírus se faz necessário. A literatura descreve alguns compostos sintéticos (derivados do ácido siálico) e extratos de plantas que inibiram algumas cepas do rotavírus *in vitro* (TAKAHASHI, et al., 2001).

Atualmente não existe uma vacina eficaz para a prevenção da infecção pelo vírus sincicial respiratório (RSV). A imunoglobulina hiperimune para o RSV e o palivizumab, um anticorpo monoclonal que tem como alvo a proteína de fusão F do RSV, são alternativas para profilaxia individual em pacientes de maior risco, mas de uso bastante limitado pelo alto custo (WYDE et al., 2005).

Não existe tratamento específico para a doença causada pelo RSV. Medidas de alívio dos sintomas e de suporte ventilatório e de manutenção do estado geral, quando necessárias, são indicadas. A ribavirina tem sido usada, em aerossol, em pacientes com formas graves da doença, em especial em imunocomprometidos e em crianças infectadas que apresentam altos riscos de apresentar sequelas. A utilização do ribavirina é limitada devido seu alto custo e ao seu potencial mutagênico (YU et al., 2006).

Os problemas associados com essas opções terapêuticas disponíveis e o contínuo impacto médico das infecções causadas pelo RSV têm impulsionado as pesquisas por novos fármacos ou medidas terapêuticas mais seguras, eficientes e de menor custo para prevenir ou tratar as infecções causadas por esse vírus (WYDE et al., 2005).

O aumento do conhecimento a respeito dos eventos moleculares e bioquímicos da replicação viral em muito contribuiu para o surgimento dos compostos antivirais utilizados clinicamente e citados acima (KLEYMANN, 2003; VERLI; BARREIRO, 2005). A principal ênfase que tem sido dada no desenvolvimento de novos fármacos antivirais é a busca de novos alvos moleculares específicos e, conseqüentemente, com diferentes mecanismos daqueles que formam as terapias atuais (KINCHINGTON et al., 1995).

Recentemente, ensaios de triagem de alta demanda de coleções de compostos identificaram um novo alvo molecular para os herpesvírus, o complexo helicase/primase, o qual tem um papel importante na etapa imediata do ciclo de replicação viral, sendo um componente essencial da maquinaria de replicação. O composto BAY 57-1293 que pertencente à classe das tiazolisulfonamidas foi identificado como inibidor do complexo helicase/primase por estudos de SAR, estando em fase de avaliação pré-clínica (BAUMEISTER et al., 2007; KAUFMAN et al., 2008)

É importante citar que estratégias, tais como a determinação estrutural por cristalografia de raios X, a microscopia eletrônica, a modelagem molecular, a ressonância magnética nuclear, a pesquisa racional de fármacos, a bioinformática e os processos de triagem de alta demanda, baseados em alvos moleculares, têm sido empregadas na busca de novos fármacos antivirais (KLEYMANN, 2003). A descoberta e o desenvolvimento de inibidores da protease do HIV constituíram-se em um sucesso absoluto da farmacologia e da biologia estrutural modernas. É um dos melhores exemplos de planejamento de fármacos (structure-based drug design) ou planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (VERLI; BARREIRO, 2005).

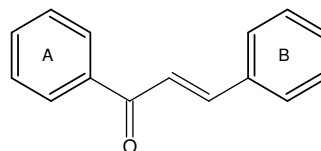
2.4 COMPOSTOS DE INTERESSE

Muitas classes de compostos orgânicos têm demonstrado efeitos farmacológicos promissores e a literatura científica relata um crescimento significativo de novas moléculas com potência similar ou superior à dos fármacos disponíveis. Entre estes compostos, inserem-se as chalconas, as sulfonamidas e as quinolinas, compostos que foram sintetizadas neste trabalho.

2.4.1 Chalconas

As chalconas (**2**) são compostos precursores da biossíntese dos flavonóides e dos isoflavonóides, sendo amplamente distribuídas no reino vegetal. Quimicamente possuem a nomenclatura 2(*E*)-1,3-difenil-2propen-1-ona, sendo definidas como cetonas aromáticas alfa,beta-insaturadas, constituídas por dois anéis aromáticos (substituídos ou não) interligados por uma cadeia enólica (ZUANAZZI; MONTANHA,

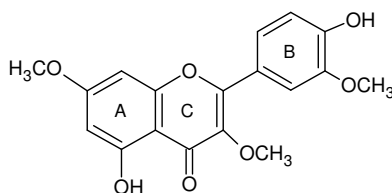
2003).



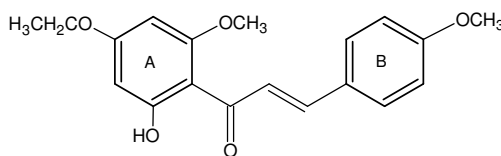
(2)

As chalconas naturais e sintéticas são conhecidas por apresentar promissoras atividades farmacológicas, incluindo antiinflamatória (HSIEH et al., 2000), antitripanosoma (LUNARDI et al., 2003), antibacteriana (NIELSEN et al., 2004), antiviral (NINOMIYA et al., 1990; UCHIUMI et al., 2003; LALL et al., 2006), antitumoral (YE et al., 2004, CABRERA et al., 2007), antileishmania (DIMMOCK et al., 1999; HERMOSO et al., 2003) antimalárica (GO et al., 2004; BHATTACHARJEE et al., 2007) e antioxidante (GO et al., 2005). Nesta revisão, restringiu-se à atividade antiviral das chalconas.

O composto 4',5-dihidroxi-3,3',7-trimetoxi-flavona (3), isolada de uma planta da medicina chinesa, *Agastache rugosa* Kuntze, apresentou uma potente atividade antipicovírus. Estudos com análogos do composto (3) levaram a identificação do composto 4'-etoxi-2'-hidroxi-4,6'-dimetoxichalcona (4), o qual inibiu a replicação de diferentes sorotipos de rinovírus, mas não apresentou atividade contra outros picovírus (ISHITSUKA et al., 1982). O composto (4) inativou diretamente o rinovírus humano, ligando-se a um sítio específico do capsídeo protéico. A literatura sugere que esse composto interfere com mudanças conformacionais, que ocorrem durante o processo de desmontagem viral dentro da célula (NINOMIYA et al., 1984). Esse composto também inibiu o crescimento do poliovírus tipo 1 (cepa Mahoney), através do bloqueio da desmontagem viral, embora não tenha mostrado efeito sobre a adsorção ou entrada das partículas virais nas células (ALMELA; GONZALEZ; CARRASCO, 1991).



(3)



(4)

A chalcona (4) mostrou ser capaz de agir sinergicamente com outros

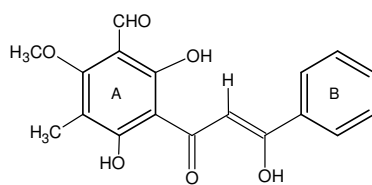
compostos antivirais, tais como a dicloroflavana e o enviroxime, contra o rinovírus humano tipo 9 (AHMAD, 1986), mas mostrou ser ineficaz na prevenção ou tratamento de infecções em voluntários humanos (AL-NAKIB et al., 1987).

O éster fosfato dessa chalcona, o qual foi designado como pró-fármaco da chalcona (**4**), foi administrado oralmente a voluntários humanos. Embora tenha sido encontrada uma concentração plasmática do composto ativo acima daquela requerida para a inibição do rinovírus tipo 9 *in vitro*, nenhuma evidência sugeriu que o pró-fármaco tenha prevenido a infecção nos voluntários vacinados (PHILLPOTTS et al., 1984).

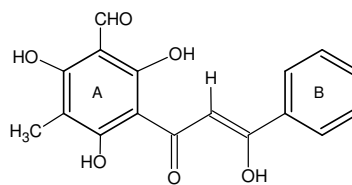
A síntese de vários análogos da chalcona (**4**) permitiu a detecção de análogos de amidas, que foram 4,5 a 10 vezes mais ativos do que o composto-modelo contra o rinovírus humano tipo 2. Esses análogos de amidas inibiram competitivamente a ligação da chalcona (**4**) ao sítio específico do capsídeo viral (NINOMIYA et al., 1990). Como a maioria dos fármacos antivirais, a chalcona (**4**) não impediu a replicação de cepas de rinovírus mutantes resistentes à este composto, embora sua infecciosidade tenha sido reduzida, quando comparada à da cepa selvagem (YASIN; AL NAKIB; TYRREL, 1990).

Três ésteres glicosídicos de chalconas, isolados das folhas de *Bidens leucantha* Willd (Asteraceae), apresentaram um efeito inibitório moderado sobre a replicação do vírus HIV (DE TOMMASI et al., 1997).

A chalcona 2-metoxi-3-metil-4,6-dihidroxi-5-(3'-hidroxi)cinamoilbenzaldeído (**5**), isolada de *Desmos* spp. (Annonaceae), demonstrou uma potente atividade anti-HIV, com alto índice de seletividade (IS= 489). Entretanto, o composto 3-hidroxi-3-metil-4,6-dihidroxi-5-(3'-hidroxi) cinamoilbenzaldeído (**6**), o qual apresenta uma hidroxila no lugar do grupo metóxi do C₂ foi inativo. Assim, a presença do grupo metóxi no C₂ da chalcona parece ser crítico para a atividade anti-HIV. O composto (**5**) foi considerado um excelente composto-modelo para o desenvolvimento de fármacos anti-HIV, onde tanto os substituintes aromáticos como a função ceto-enol são alvos para os estudos de SAR (WU et al., 2003).

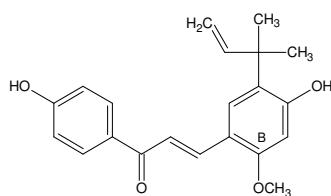


(5)

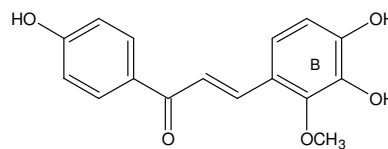


(6)

A licochalcona A (7), isolada das raízes de *Glycyrrhiza sp.* (Fabaceae), inibiu a formação de sincícios nas células OKM-1, infectadas com o vírus HIV (HATANO, et al., 1988). Uchiuni et al. (2003) demonstraram que as licochalconas A e B suprimem a atividade do promotor do HIV induzido pelo 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Estas chalconas não suprimiram o promotor do citomegalovírus, sugerindo que as mesmas agem especificamente sobre o promotor do HIV. Assim, os compostos (7) e (8) poderiam ser utilizados como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos anti-HIV, tendo como alvo a supressão da expressão deste gene específico, a um nível transcricional.



(7)



(8)

2.4.2 Sulfonamidas

A sulfonamida é o grupo farmacofórico de muitos fármacos que estão disponíveis para uso clínico. Estes fármacos são utilizados como antibacteriano (DREW, 2000), diurético (PRANDOTA, 2002), antidiabético oral (KECSKEMETI et al., 2002), antimalárico (PETERSEN, 2004; BAIRD, 2005), e como inibidores da protease do vírus HIV (SUPURAN; CASINI; SCOZZAFAVA, 2003, WINUM et al., 2006).

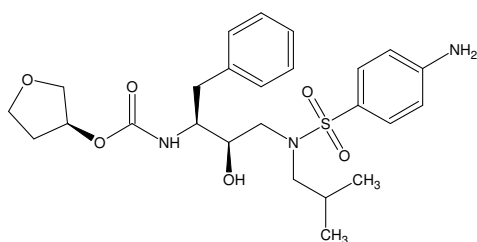
Novos derivados de sulfonamida têm sido descritos por apresentarem outras atividades farmacológicas, tais como atividade antitumoral (OWA et al., 2000), antileishmania (CHIBALE et al., 2003; DELFÍN et al., 2006), antagonismo do receptor da endotelina (DIETERLE et al., 2004), inibição da anidrase carbônica (SUPURAN; SCOZZAFAVA; CASINI, 2003), inibição da metaloproteinase de matriz (ROSSELO

et al., 2005) e inibição da caspase-1 (HARTER et al., 2004). Nesta revisão, restringiu-se à atividade antiviral das sulfonamidas.

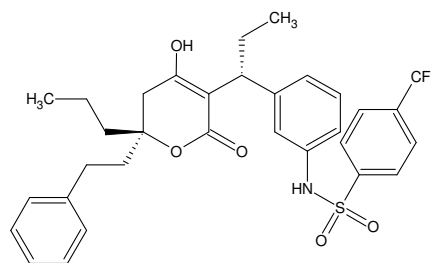
Alguns inibidores da protease do vírus HIV usados clinicamente, como o amprenavir (**9**); e outros em testes clínicos, como o tripanavir (**10**), possuem o grupamento sulfonamida em suas moléculas, o qual é crítico para a potência destes fármacos. A serina protease do vírus HCMV também pode ser inibida por derivados de sulfonamidas (SUPURAN; CASINI; SCOZZAFA, 2003).

No amprenavir (**9**) o grupamento sulfonamida é importante visto que um dos seus átomos de oxigênio interage com uma molécula de água presente em todos os complexos da protease do HIV descritos até o presente momento. Este grupo assegura um aumento da solubilidade em água. Enquanto o grupo aromático conectado ao grupo sulfonamida interage com um subsítio da enzima. O amprenavir apresenta uma maior solubilidade, quando comparado com outros inibidores da protease, o que lhe garante uma biodisponibilidade oral adequada (SUPURAN; CASINI; SCOZZAFA, 2003).

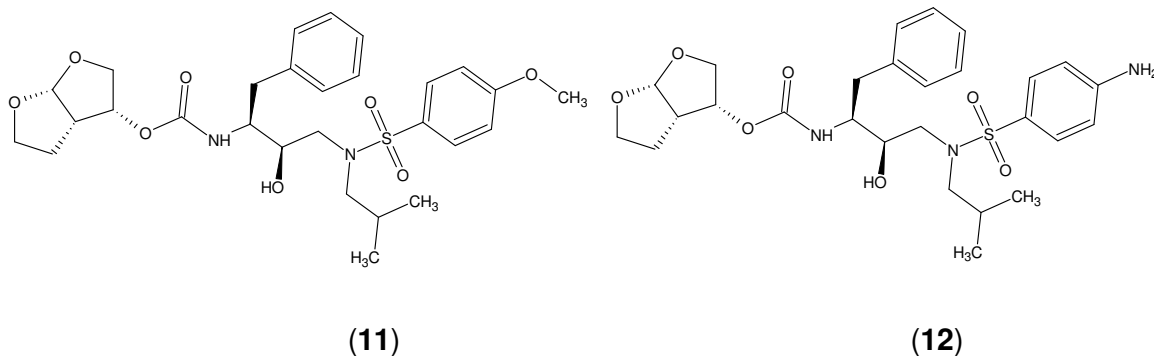
O composto TMC 126 (**11**) e TMC 114 (**12**), os quais são similares ao amprenavir, mostraram atividade anti-HIV promissora, frente a várias cepas multi-resistentes. Estudos de absorção do composto TMC 114 indicaram que este apresenta propriedades farmacocinéticas comparáveis às dos inibidores da protease do HIV usados clinicamente (SURLERAUX et al., 2005).



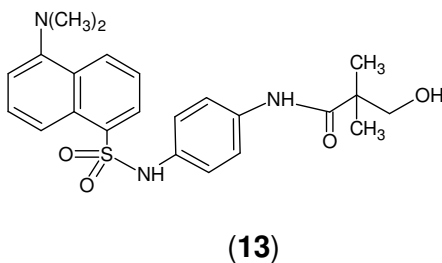
(9)



(10)

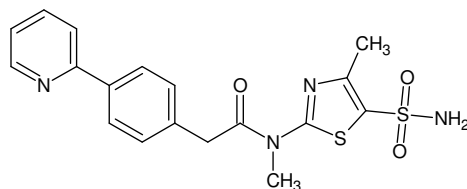


A atividade antiviral do composto BAY 38-4766 {3-hidroxi-2,2-dimetil-N-[4({[5-(dimetilamino)-1-naftil]sulfonil}amino)-fenil]propanamida} (**13**) foi detectada através de estudos de triagem de alta demanda, demonstrando ser um inibidor seletivo da replicação do citomegalovírus (REEFSCHLAEGER et al., 2001). Estudos mecanísticos demonstraram que esta classe de compostos não-nucleosídicos inibe seletivamente a clivagem e o empacotamento dos concatâmeros do DNA viral durante o processo de replicação (SCHLEISS et al., 2005). O fato de que este composto tenha como alvo uma etapa da maturação do DNA viral, que não ocorre em células eucarióticas, faz do mesmo uma estratégia altamente específica para combater as infecções pelo HCMV (DE CLERCQ, 2003).



O composto BAY 57-1293 (**14**) é um membro das tiazolilsulfonamidas, uma nova classe de compostos não nucleosídicos com potente atividade anti-herpética *in vitro* e *in vivo*. Ele apresentou um novo mecanismo de ação, inibindo a replicação dos Herpes Simplex Virus tipos 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2), através da inibição da atividade enzimática do complexo primase-helicase viral (BETZ et al., 2002). Ao contrário do aciclovir, que é o fármaco de escolha para o tratamento do herpes, esta nova classe de compostos não requer mecanismo de ativação para inibir o alvo viral. O diferente mecanismo de ação e o sinergismo observado entre o composto BAY 57-1293 e os inibidores da polimerase (aciclovir e penciclovir) *in vitro* são dados importantes quando se considera a combinação de terapias. O perfil farmacocinético

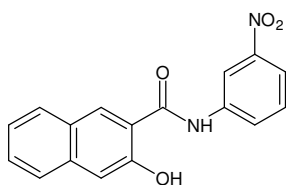
deste composto pode ser descrito como sendo de baixa depuração, biodisponibilidade oral adequada e um longo tempo de meia vida plasmático (KLEYMANN, 2003).



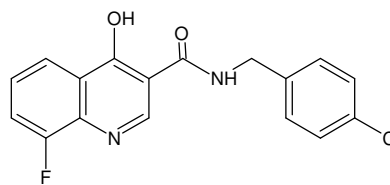
(14)

2.4.3 Quinolinas

Uma nova classe de compostos ativos contra vários vírus da família Herpesviridae foi descoberta através da triagem de alta demanda de uma coleção de aproximadamente 80.000 compostos. O programa usou como alvo molecular a DNA polimerase do citomegalovírus humano. O composto PNU-26370 (**15**), um derivado naftaleno carboxamida, foi identificado como um promissor inibidor não nucleosídico desta enzima, sendo utilizado como composto-modelo (VAILLANCOURT et al., 2000). Estudos de SAR demonstraram que um núcleo quinolina poderia substituir o núcleo naftaleno desse protótipo, resultando na síntese do composto PNU-145185 (**16**), um análogo da 4-hidroxiquinolina. Substituições no C₆ do anel quinolínico produziram os compostos PNU-181128 (**17**) e PNU-181465 (**18**) com aumento de 10 vezes da atividade antiviral (OJEN et al., 2002).



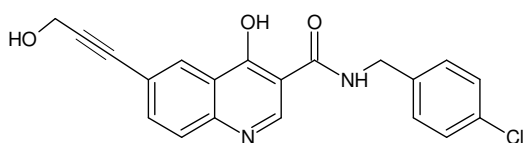
(15)



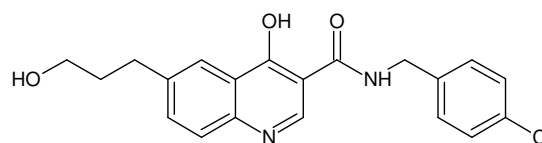
(16)

Os compostos da classe 4-hidroxiquinolina-3-carboxamida inibiram a DNA polimerase do HCMV, do HSV-1, do HSV-2 e do vírus varicela-zoster (VZV), com valores de constante de inibição (K_i) de 0,07 a 0,95 μ M, mas não inibiram as polimerases humanas α , δ , e γ . Ensaios *in vitro* confirmaram que esses compostos também apresentam uma potente atividade antiviral contra cepas humanas de HCMV, VZV, HSV-1 e HSV-2, tanto cepas padrões como isoladas clinicamente, assim como contra herpesvírus de outros animais, tais como o herpesvírus bovino

tipo I (BHV-1) e o herpesvírus felino tipo 1 (FHV-1) (OIEN et al., 2002).



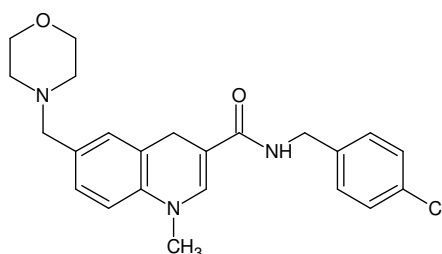
(17)



(18)

Os estudos do mecanismo de ação correlacionaram a atividade antiviral detectada com a inibição da DNA polimerase observada. Os estudos de cinética enzimática indicaram que os compostos 4-hidroxiquinolina-3-carboxamida são inibidores competitivos do sítio de ligação dos nucleosídeos na DNA polimerase do HCMV. Entretanto, não foi detectada resistência cruzada com cepas mutantes do HCMV resistentes ao ganciclovir ou do HSV-1 resistente ao aciclovir (OIEN et al., 2002).

Em estudos *in vivo*, o composto PNU-183792, derivado 4-oxo-dihidroquinolina **19** apresentou biodisponibilidade oral adequada e reduziu a mortalidade de ratos infectados com citomegalovírus (BRIDEAU et al., 2002). Estudos posteriores demonstraram que este composto inibiu a replicação do herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) (THOMSEN et al., 2003). Análogos do composto **19** foram ativos contra os vírus HCMV, HSV-1, HSV-2, VZV, HHV-8, contra cepas do HSV-1 e do VZV resistentes ao aciclovir e contra cepas do HCMV resistentes ao ganciclovir (HARTLINE, et al., 2005).



(19)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Sintetizar e avaliar a citotoxicidade e a potencial atividade antiviral de uma série de sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona e de uma série de sulfonamidas derivadas da quinolina.
- Realizar uma triagem da potencial atividade antiviral de diferentes classes de compostos sintéticos.
- Realizar o estudo qualitativo de correlações estrutura-atividade, para que se possa propor novas modificações moleculares, a fim de obter análogos mais potentes.
- Estudar o mecanismo de ação da atividade antiviral dos compostos mais promissores.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar, purificar e caracterizar uma série de sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona e série de sulfonamidas derivadas da quinolina.
- Avaliar a citotoxicidade destas sulfonamidas frente às células VERO e MA 104, através do ensaio colorimétrico do MTT e das GMK-AH1 e HEp-2, através do ensaio colorimétrico do MTS.
- Avaliar a potencial atividade antiviral destas sulfonamidas na inibição da replicação do Herpes Simplex Virus tipo 1 (cepa KOS e 29R) e rotavírus símio (cepa SA11), através do ensaio colorimétrico do MTT e do Herpes Simplex Virus tipo 2 (cepa 333) e do vírus sincicial respiratório cepa A2, através do método de redução de formação de placas de lise.
- Realizar uma triagem da potencial atividade antiviral de diferentes classes de compostos sintéticos, com o intuito de identificar compostos-modelos que inibam a replicação dos vírus: herpes simplex vírus tipo 1 (cepa KOS e 29R), rotavírus símio (cepa SA11), herpes simplex vírus tipo 2 (cepa 333) e do vírus sincicial respiratório cepa A2.
- Realizar o estudo qualitativo de correlações estrutura-atividade, para que se

possa propor novas modificações moleculares, a fim de obter análogos mais potentes.

- Realizar o estudo do mecanismo de ação antiviral *in vitro* dos compostos mais ativos e promissores, incluindo atividade virucida; interferência na multiplicação viral, na expressão de proteínas virais, na síntese do DNA viral, na dispersão célula a célula dos vírus e na ligação dos vírus nos receptores celulares.
- Preparar e avaliar a sensibilidade de variantes do HSV resistentes.
- Propor o mecanismo de ação antiviral para compostos selecionados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE

Todas as reações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de alumínio com sílica gel 60 GF 254 da Merck, visualização em luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366 nm) ou com revelação com vapores de iodo. O ponto de fusão dos compostos foi determinado em aparelho digital de ponto de fusão, MQAPF-301, Microquímica Equipamento Ltda, não sendo corrigidos.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C foram realizados com os equipamentos Bruker AC-200F (200 MHz) e Varian Oxford AS-400 (400 MHz), tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS) e sendo relatados em ppm. Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos através de espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo 16 PC-FTIR, utilizando pastilha de KBr. As análises elementares foram realizadas com o instrumento Carlo Erba EA 1110.

Os solventes e reagentes empregados foram de pureza analítica procedentes da Fluka, Merck, Sigma-Aldrich e Nuclear.

4.1.1 Procedimento geral para a síntese das sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona

A - Síntese da 4-metoxichalcona (20) (VOGEL, 1989)

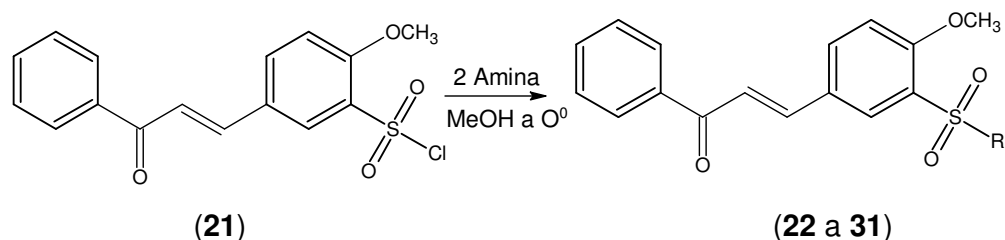
O 4-metoxibenzaldeído (11,33 g, 83,33 mmol) e a acetofenona (10 g, 83,33 mmol) foram dissolvidos em uma solução de 45 mL de hidróxido de sódio a 10% mais 27 mL de etanol e mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente durante uma noite. A formação do produto foi acompanhada por cromatografia de camada delgada CCD (eluente: hexano/acetato de etila 80:20). O produto obtido foi filtrado em Büchner e lavado com água destilada gelada até que as águas de lavagem se apresentassem neutras ao papel de tornassol. O produto isolado foi seco em dessecador e posteriormente foi recristalizada em álcool 95%, apresentando 80% de rendimento e p.f. $74,5\text{--}76,3^\circ\text{C}$ (Lit. p.f. 74°C - PAVIA et al., 2005).

B - Cloreto da 4-metoxichalcona-3-sulfonila (21)

A 4-metoxichalcona (6,63 g, 27,87 mmol) foi adicionada lentamente ao ácido clorossulfônico* (19,48 g, 167,2 mmol) em banho de gelo. A mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente por uma semana. A formação do produto foi acompanhada por cromatografia de camada delgada CCD (eluente: hexano/acetato de etila 80:20). A solução vermelha obtida foi vertida gota a gota sobre gelo picado, com agitação. O precipitado formado, um sólido amarelo, foi filtrado sob vácuo, lavado com água gelada e seco em dessecador a vácuo, contendo hidróxido de potássio (CREMLYN; SWINBOURNE; SHODE, 1984).

C- Síntese das sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona (22 a 30)

O procedimento geral para a síntese da série de sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona seguiu o Esquema 1, onde a amina (2 moles) (Tabela 1) foi adicionada lentamente ao cloreto da 4-metoxichalcona-3-sulfonila (21) (1 mol) em 10 mL de metanol, a 0°C. A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente, por 1 h e a reação foi acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 70:30), o produto obtido foi colocado sobre água/gelo e o precipitado formado foi e filtrado sob vácuo, lavado com água, recristalizado em etanol a quente e seco em dessecador a vácuo, contendo hidróxido de potássio.



R = dimetilamino; etilamino; morfolino; pirrolidino; benzilamino; NHC_6H_5 ; $\text{NHC}_6\text{H}_4\text{OMe-}p$; $\text{NHC}_6\text{H}_4\text{Cl-}p$; $\text{NHC}_6\text{H}_3\text{Cl}_2\text{-}3,4$

Esquema 1: Síntese das sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona utilizando diferentes aminas.

*É um **ácido** forte, muito corrosivo e que liberta vapores irritantes. Requer **cuidados** especiais de manipulação.

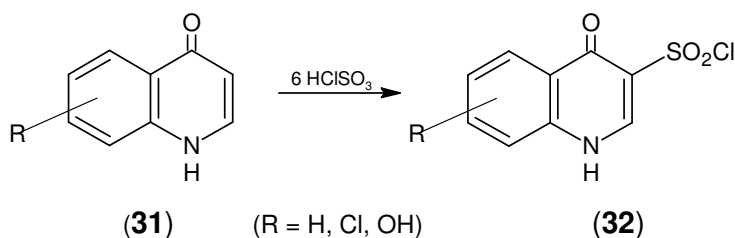
Tabela 1: Aminas utilizadas na síntese das sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona

Composto	Amina
22	Dimetilamina
23	Etilamina
24	Morfolina
25	Pirrolidina
26	Benzilamina
27	Anilina
28	4-metoxi-anilina
29	4-cloro-anilina
30	3,4-di-cloro-anilina

4.1.2 Procedimento geral para a síntese das sulfonamidas derivadas da quinolona ou da quinolina

4.1.2.1 Procedimento 1 – Síntese do cloreto da quinolona-3-sulfonila (**32**)

A quinolona (**31**) (1 mol) foi adicionada lentamente ao ácido clorossulfônico (6 moles) em banho de gelo. A mistura reacional foi aquecida em banho-maria entre 70°C a 86°C, por 1 h e posteriormente resfriada à temperatura ambiente e colocada sobre água/gelo (100 mL) para formar o cloreto da quinolona-3-sulfonila (**32**). A reação foi acompanhada por CCD (eluente: acetato de etila/metanol 95:5). O composto (**32**) foi então seco em dessecador a vácuo, contendo hidróxido de potássio (Esquema 2).

**Esquema 2:** Síntese do cloreto da quinolona-3-sulfonila

4.1.2.2 Procedimento 2 – Síntese das sulfonamidas derivadas da quinolona, utilizando derivados arilaminometilênicos do Ácido de Meldrum.

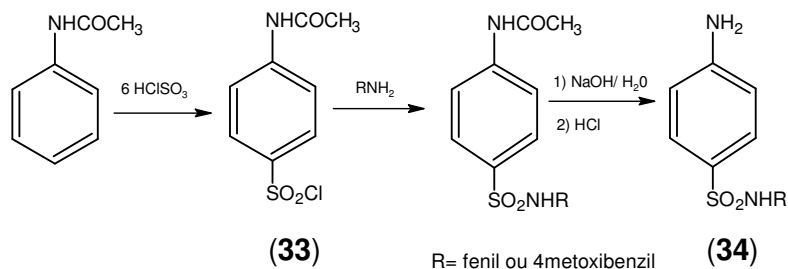
A- Cloreto p-acetamidobenzenosulfonila (33)

A acetanilida (6 g, 44,4 mmol) foi adicionada lentamente ao ácido clorossulfônico (31 g, 266,6 mmol) em banho de gelo. A mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente por 10 min e posteriormente aquecida em banho-maria por mais 10 min, para completar a reação. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 50:50). A solução obtida foi vertida gota a gota sobre gelo picado, com agitação vigorosa. O precipitado formado, um sólido branco, foi filtrado sob vácuo, lavado com água gelada e seco em dessecador a vácuo, contendo hidróxido de potássio (PAVIA et al., 1998).

B- 4-amino-benzenossulfonamida (34)

O procedimento geral para a síntese das 4-amino-benzenossulfonamida seguiu o Esquema 3, onde a anilina ou a 4-metoxibenzilamina (2 moles) foram adicionadas lentamente ao cloreto p-acetamidobenzenosulfonila (**33**) (1 mol) em 10 mL de metanol, a 0°C. A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente, por 2 h e a reação foi acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 50:50). O produto obtido foi colocado sobre água/gelo e o precipitado formado foi filtrado sob vácuo.

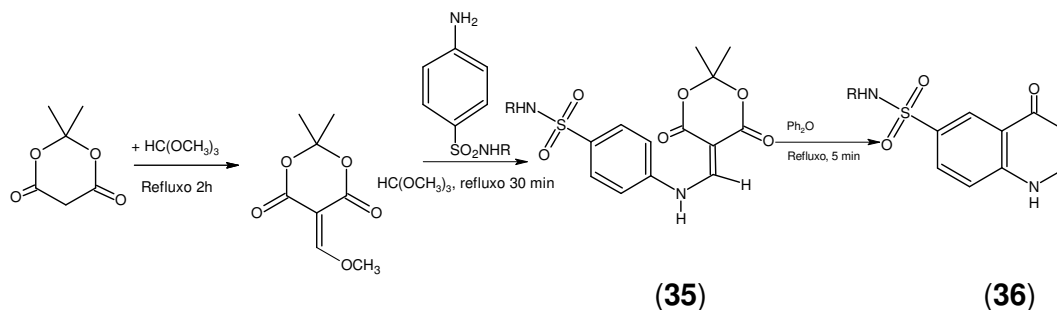
O produto bruto, obtido na reação anterior, foi tratado com solução de NaOH (10%, 10 mL). O balão foi acoplado em condensador de refluxo e aquecido por 40 min a 100°C. Após este período a mistura foi resfriada até a temperatura ambiente e neutralizada com HCl concentrado até pH aproximadamente 6,0. A mistura foi resfriada em banho de gelo até a total precipitação do produto, filtrada a vácuo, lavada com pequeno volume de água gelada. O produto (**34**) foi recristalizado em etanol 95% a quente e seco em dessecador a vácuo, contendo hidróxido de potássio.



Esquema 3: Síntese da 4-aminobenzenosulfonamida substituída

C- Derivados arilaminometilênicos do Ácido de Meldrum (35)

Uma solução de ácido de Meldrum (4,8 mmol) em ortoformato de trimetila (7 mL) foi aquecida sob refluxo por 2 h. A esta solução, adicionou-se a 4-aminobenzenossulfonamida (**34**) (2,4 mmol). O refluxo foi prolongado por mais 30 min. O material formado foi filtrado, lavado com metanol e recristalizado em metanol a quente e seco em dessecador a vácuo, contendo hidróxido de potássio (Esquema 4).



Esquema 4: Síntese da sulfonamida derivada da quinolona.

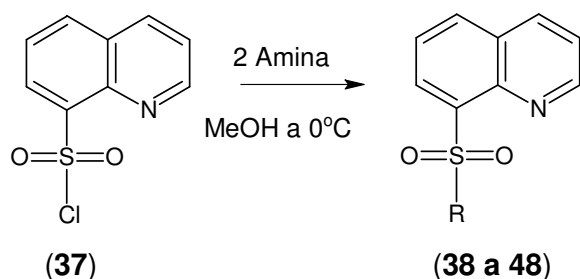
D- Ciclização dos adutos do ácido de Meldrum (36)

O aduto (**35**) (1 mmol) foi refluxado em difeniléter (15 mL) previamente aquecido à 250 °C por 5 min. A mistura foi resfriada, sendo o produto precipitado sob a adição de hexano ou éter etílico. O produto obtido foi lavado com hexano (Esquema 4).

4.1.2.3 Procedimento 3 – Síntese das sulfonamidas derivadas da quinolina, utilizando o cloreto da quinolina-8-sulfonila (38 a 48)

O procedimento geral para a síntese da série de sulfonamidas derivadas da quinolina seguiu o Esquema 5, onde a amina (3,6 mmoles) (Tabela 2) foi adicionada

lentamente ao cloreto da quinolina-8-sulfonila (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (**37**) (1,8 mmoles) em 10 mL de metanol, a 0°C. A mistura foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 2 h. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 70:30). O produto obtido foi colocado sobre água/gelo e o precipitado formado foi filtrado sob vácuo, lavado com água, recristalizado em metanol:diclorometano (95:5) a quente e seco em dessecador a vácuo, contendo hidróxido de potássio.



R = etilamino; benzilamino; $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_2$ -3,4; $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OMe}$ -*p*; $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}$ -*p*; Morfolino; $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{OMe}$ -*p*; pirrolidino, piperidino; $\text{NHC}_6\text{H}_4\text{Cl}$ -*p*; $\text{NHC}_6\text{H}_3\text{Cl}_2$ -3,4.

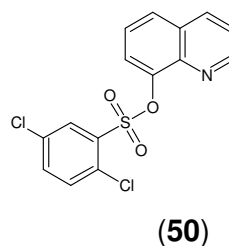
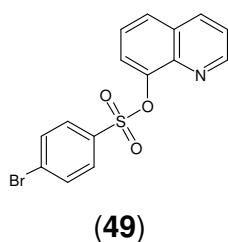
Esquema 5: Síntese das sulfonamidas derivadas da quinolina utilizando diferentes aminas.

Tabela 2: Aminas utilizadas na síntese das sulfonamidas derivadas da quinolina

Composto	Amina
38	etilamina
39	Benzilamina
40	3,4-dicloro-benzilamina
41	4-metoxi-benzilamina
42	4-cloro-benzilamina
43	Morfolina
44	4-metoxi-fenetilamina
45	Pirrolidina
46	Piperidina
47	4-cloro-anilina
48	3,4-dicloro-anilina

4.1.3 Procedimento para a síntese do sulfonatos derivados da 8-hidroxi-quinolina (compostos 49 e 50)

A uma solução do cloreto de 4-bromo-benzenosulfonila ou 2,5-diclorobenzenosulfonil sulfonila (1,1 equivalentes) em 4 mL de piridina, resfriada a 0°C sob agitação, adicionou-se 1 equivalente da 8-hidroxiquinolina. A mistura foi agitada por 24 h a temperatura ambiente e posteriormente colocada sob gelo picado. O precipitado formado foi filtrado e lavado com água, sendo a recristalização do material feita em metanol/diclorometano e seco em dessecador a vácuo, contendo hidróxido de potássio.



4.1.4 Procedimento para a síntese do composto 2,2-dimetil-5-[(5-metiltio)-1,3,4-tiadiazol-2-ilamino]metileno]-1,3-dioxano-4,6-dione (51)

Uma solução de ácido de Meldrum (5,9 mmol) em ortoformato de trimetila (7 mL) foi aquecida sob refluxo por 2h. A esta solução, adicionou-se o 2-amino-5-(metiltio)1,3,4-tiadiazol (5,02 mmol). O refluxo foi prolongado por mais 15 min e o material obtido foi recristalizado em etanol.

4.1.5 Diferentes classes de compostos sintéticos utilizados nos testes de triagem da potencial atividade antiviral

Os compostos citados nas Tabelas 3 a 13 foram submetidos a um programa de triagem aleatório a fim de identificar compostos-modelos que apresentem atividade antiviral contra o HSV-1 (cepas KOS e 29R) e o rotavírus SA-11.

Na triagem da atividade antiviral foram testados os compostos sintetizados por outros componentes do Laboratório de Síntese Estrutura e Atividade, sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo J. Nunes incluindo: os compostos (52) a (57) sintetizados por Andrade (2004); os compostos (58) a (60), (64) a (66) e (69) a (80) sintetizados por Walter et al., (2004); e os compostos (61) a (63), (67), (68) e (81) a (90) sintetizados por de Oliveira (2005). Os compostos (91) a (144) foram sintetizados pelo Silva (2006), sob a orientação do Prof. Dr. Antonio Carlos Joussef.

Tabela 3: Aziridinas utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.

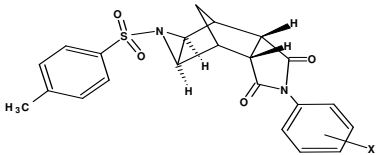
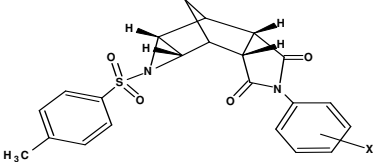
 exo-endo (a)		 endo-endo (b)	
Composto	Substituinte (X)	Composto	Substituinte (X)
52	H	55	3,4-diCl
53	H	56	4-CH ₃
54	4-Cl	57	2,3-dimetil

Tabela 4: Imidas cíclicas utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.

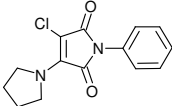
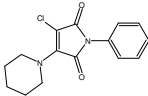
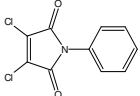
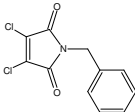
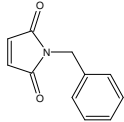
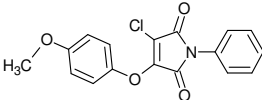
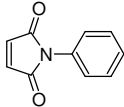
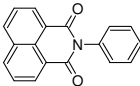
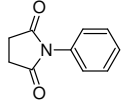
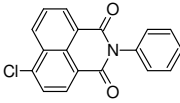
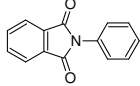
Composto	Estrutura	Composto	Estrutura
58		64	
59		65	
60		66	
61		67	
62		68	
63			

Tabela 5: Sulfonamidas derivadas de succinimidas utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.

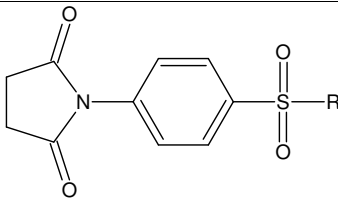
		
Composto	Substituinte (R)	
69	piperidino	
70	morfolino	
71	N(CH ₃) ₂	
72	OC ₆ H ₄ OMe- <i>p</i>	

Tabela 6: Sulfonamidas derivadas de maleimidas utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.

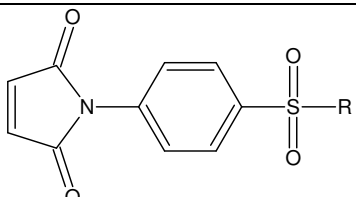
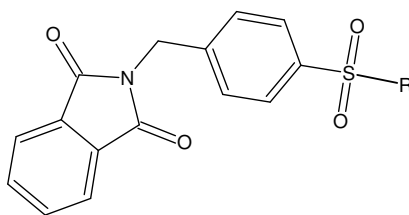
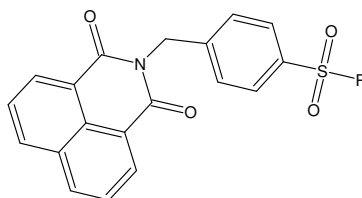
		
Composto	Substituinte (R)	Substituinte (R ₁)
73	NHC ₆ H ₄ CH ₃ - <i>p</i>	piperidino
74	NHC ₆ H ₄ Br- <i>p</i>	piperidino
75	NHC ₆ H ₄ MeO- <i>p</i>	piperidino
76	NHC ₆ H ₄ Cl- <i>p</i>	piperidino
77	dimetilanilino	pirrolidino
78	NHC ₆ H ₄ Cl- <i>p</i>	pirrolidino
79	morfolino	pirrolidino
80	morfolino	pirrolidino

Tabela 7: Sulfonamidas derivadas de *N*-benzilftalimida utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.



Composto	Substituente (R)
81	3-aminopiridino
82	4-aminopiridino
83	4,6-dimetil-2-aminopiridino
84	2-aminopirimidino
85	2-aminopiridino
86	2-cloro-3-aminopiridino

Tabela 8: Sulfonamidas derivadas de *N*-benzilnaftalimida utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.



Composto	Substituente (R)
87	4,6-dimetil-2-aminopiridino
88	3-aminopiridino
89	2-aminopiridino
90	2-aminopirimidino

Tabela 9: Adutos do ácido de Meldrum utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.

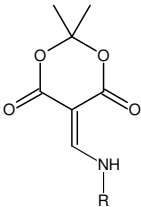
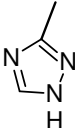
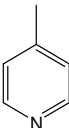
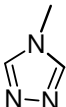
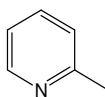
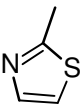
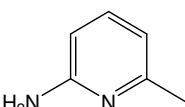
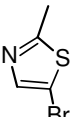
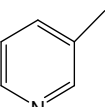

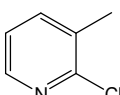
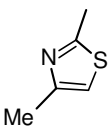
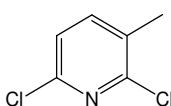
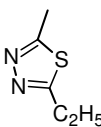
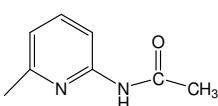
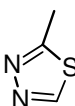
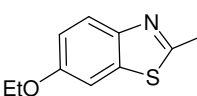
			
Composto	Substituinte (R)	Composto	Substituinte (R)
91		99	
92		100	
93		101	
94		102	
95		103	
96		104	
97		105	
98		106	

Tabela 10: Adutos do ácido de Meldrum utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.

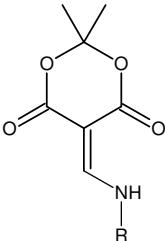
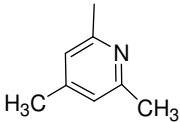
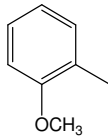

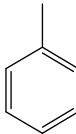
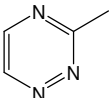
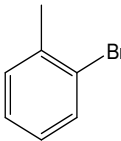
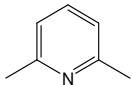
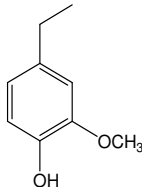
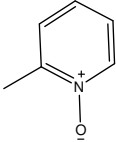
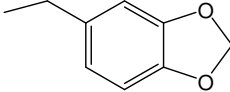
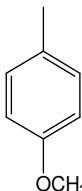
			
Composto	Substituinte (R)	Composto	Substituinte (R)
107		113	
108		114	
109		115	
110		116	
111	 ·HCl	117	
112			

Tabela 11: Tiazolpirimidinona e naftiridinas utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.

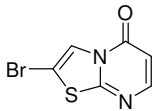
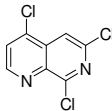
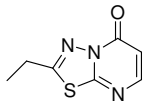
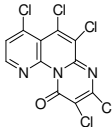
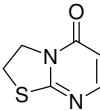
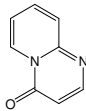
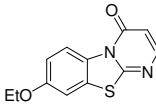
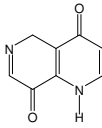
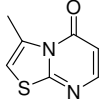
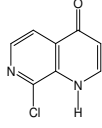
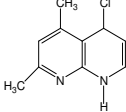
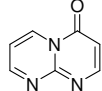
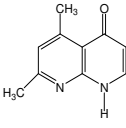
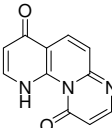
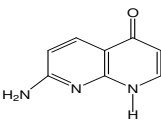
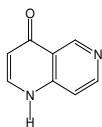
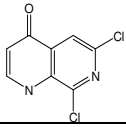
Composto	Estrutura	Composto	Estrutura
118		127	
119		128	
120		129	
121		130	
122		131	
123		132	
124		133	
125		134	
126			

Tabela 12: Quinolinas utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.

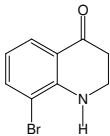
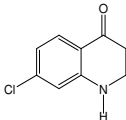
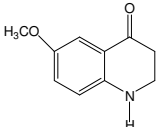
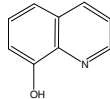
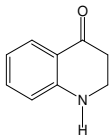
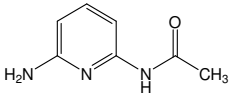
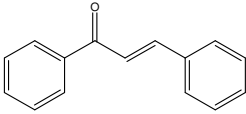
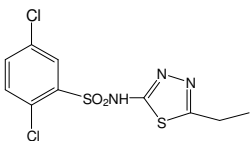
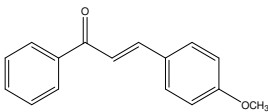
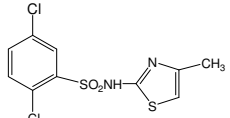
Composto	Estrutura	Composto	Estrutura
135		138	
136		139	
137			

Tabela 13: Outros compostos selecionados para avaliação utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.

Composto	Estrutura	Composto	Estrutura
140		143	
141		144	
142			

Também foram testados diferentes oligossacarídeos e polissacarídeos sulfatados e seus derivados sintetizados pelo Grupo de Câncer e Biologia Vascular, da Universidade Nacional Australiana, Canberra, Austrália, sob a coordenação do Dr. Craig Freeman. Os di e trissacarídeos, rafinose, estaquiose, sucrose, erlose, panose, ácido lactobiônico, heparina derivada de mucosa suína, heparina derivada de pulmão bovino, iota-carragenina, gama-carragenina, kapa-carragenina, alfa, beta e gama- ciclodextrinas foram compradas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Todos os outros oligossacarídeos (séries da maltose, isomaltose, maltitol, celobiose e laminarina) foram comprados da Seikagaku Co (Tokyo, Japan). Os oligossacarídeos (Tabela 14) foram hipersulfatados pelo método de Parish (1999). Os derivadados de lactose sulfatados (Tabela 15) foram preparados pela sulfatação dos produtos obtidos da condensação do ácido lactobiônico e da apropriada diamina pelo método de Raake (1989). Estes compostos foram avaliados em relação a sua potencial atividade contra o RSV A2, HSV-1 cepa KOS e o HSV-2 cepa 333.

Tabela 14: Oligossacarídeos e polissacarídeos sulfatados utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.

Composto	Oligossacarídeos e polissacarídeos	Composto	Oligossacarídeos e polissacarídeos
145	Sacarose	163	Isomaltohexaose
146	Erlose	164	Isomaltoheptaose
147	Panose	165	Celobiose
148	Rafinose	166	Celotetraose
149	Estaquiose	167	Celohexaose
150	Maltose	168	Laminbiose
151	Maltotriose	169	Laminartetraose
152	Maltotetraose	170	Laminarhexaose
153	Maltopentaose	171	Alfa-ciclodextrina
154	Maltohexaose	172	Beta-ciclodextrina
155	Maltoheptaose	173	Gama-ciclodextrina
156	Maltitol	174	Suramina
157	Maltotriitol	175	Heparina derivada da mucosa intestinal suína
158	Maltopentitol	176	Heparina derivada do pulmão bovino
159	Isomaltose	177	Iota-carragenana
160	Isomaltotriose	178	Gama-carragenana
161	Isomaltitetraose	179	Kapa-carragenana
162	Isomaltopentaose		

Tabela 15: Derivados de lactose sulfatados utilizadas nos ensaios de triagem da potencial atividade antiviral.

Composto	Derivados de lactose sulfatados
180	Lactose-CO-NH-CH ₂ -CH ₂ -C ₆ H ₅
181	Lactose-CO-NH-CH ₂ -C ₆ H ₅
182	Lactose-CO-NH-C ₂ H ₅ OH
183	Lactose-CO-NH-CH ₂ -C ₆ H ₄ -CH ₂ -NH-CO-lactose (para)
184	Lactose-CO-NH-CH ₂ -C ₆ H ₄ -CH ₂ -NH-CO-lactose (meta)
185	Lactose-CO-NH-(CH ₂) ₁₂ -NH-CO-lactose
186	Lactose-CO-NH-(CH ₂) ₁₀ -NH-CO-lactose
187	Lactose-CO-NH-(CH ₂) ₈ -NH-CO-lactose
188	Lactose-CO-NH-(CH ₂) ₆ -NH-CO-lactose
189	Lactose-CO-NH-ciclohexano-NH-CO-lactose
190	Lactose-CO-NH-(CH ₂) ₅ -NH-CO-lactose
191	Lactose-CO-NH-(CH ₂) ₄ -NH-CO-lactose
192	Lactose-CO-NH-(CH ₂) ₃ -NH-CO-lactose
193	Lactose-CO-NH-CH ₂ -CHOH-CH ₂ -NH-CO-lactose
194	N-[(CH ₂) ₃ -NH-CO-lactose] ₃
195	Lactose-CONH-CH(CH ₂ CH ₂ OH) ₃
196	Lactose-CONH-bis(trispropano)-NHCO-lactose
197	Lactose-CO-NHCHCH(CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH) ₃

4.2 AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL

4.2.1 Preparação das soluções-estoque

Os compostos **22 a 30**, **38 a 48**, **49 a 51 e 52 a 144** foram diluídos em DMSO 100% em uma concentração de 50 mM e os compostos-testes **145 a 197** foram diluídos em água MilliQ[®] em uma concentração de 10 µg/mL, sendo todos mantidos a -20°C até o seu uso. Para os ensaios de citotoxicidade e atividade antiviral, os compostos foram diluídos no momento do uso em meio de cultura e a concentração final do DMSO não excedeu 1% do volume final.

4.2.2 Culturas Celulares

Foram utilizadas células VERO, que são culturas contínuas de fibroblastos de

rins do macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*), fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz, SP. Essas células foram escolhidas porque são permissivas ao Herpes Simplex Virus (HSV) e foram utilizadas nos experimentos com o vírus HSV-1 realizados no Laboratório de Virologia Aplicada/UFSC. As células GMK AH1 (GUNALP, 1965), que também são culturas contínuas de fibroblastos de rins do macaco verde da África foram utilizadas nos experimentos com os vírus HSV-1 e HSV-2 realizados no Departamento de Virologia Clínica da Universidade de Göteborg, Suécia.

A linhagem celular MA104, que são culturas contínuas de fibroblastos obtidos a partir de rins embrionários do macaco *Rhesus* permissivas à infecção *in vitro* pelo rotavírus, foram fornecidas pelo Banco de Células da UFRJ/RJ.

Também foram utilizados células HEp-2 (ATCC CCL23), que são células de carcinoma de orofaringe humana permissivas à infecção *in vitro* pelo vírus sincicial respiratório (RSV).

4.2.3 Vírus

Nos experimentos realizados no Laboratório de Virologia Aplicada/UFSC foram usados os seguintes vírus: HSV-1 cepa KOS (Universidade de Rennes, França), HSV-1 cepa 29R (resistente ao aciclovir) (Universidade de Rennes, França) e Rota vírus símio SA11 sorotipo G3 (RV-SA11) (ICB/USP, SP).

Nos experimentos realizados no Departamento de Virologia Clínica da Universidade de Göteborg, Suécia foram usados os vírus: HSV-1 KOS 321, uma cepa isolada a partir da cepa selvagem KOS (HOLLAND et al., 1983), HSV-1 KOS cepa gC-nula variante gC⁻39 (HOLLAND et al., 1984), HSV-1 MP, uma cepa gC-negativa e indutora da formação de sincício (HOGGAN AND ROIZMAN, 1959), HSV-2 333 (DUFF & RAPP, 1971) e uma cepa HSV-2 gC-negativa gCneg1 (TRYBALA et al., 2000). Para o RSV foi utilizada a cepa A2 (LEWIS et al., 1961).

4.2.4 Preparação das suspensões–estoque virais

4.2.4.1 HSV-1 e HSV-2

Cada suspensão viral foi inoculada em um frasco de cultura de 75 cm² de área, contendo uma monocamada de células VERO ou GMK AH1, cultivadas em 20 mL de meio MEM, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e

antibióticos/antifúngico, tendo sido tripsinizadas 24 h antes da infecção. Inicialmente, o meio de cultura MEM foi aspirado e a monocamada celular foi lavada 3X com tampão salina fosfato (PBS); após, foi inoculado 1 mL da suspensão viral em questão e incubou-se, durante 1 h, a 37°C, em estufa de CO₂, para permitir a adsorção e a penetração viral. O inóculo foi então retirado e 20 mL do meio MEM sem SFB foram adicionados. A incubação foi feita nas mesmas condições acima relatadas. O efeito citopático viral (ECP) foi monitorado por microscópio invertido a cada ciclo de replicação (18 h para HSV). Quando o tapete celular se mostrou totalmente infectado pelo vírus, o frasco foi congelado a -80°C e descongelado a 37°C por 3X, para o rompimento total das células e liberação das partículas virais. A suspensão viral foi aliquoteada em tubos estéreis e armazenados a -80°C até sua utilização.

4.2.4.2 Rotavírus SA11

A suspensão viral foi inoculada em um frasco de cultura de 75 cm² de área, contendo uma monocamada de células MA104, cultivadas em 20 mL de meio MEM, suplementadas com 10% de SFB e antibióticos/antifúngico, tendo sido tripsinizadas 24 h antes da infecção. O meio de cultura MEM foi aspirado e a monocamada celular foi lavada 3X com PBS. A suspensão viral foi previamente incubada, durante 30 min, a 37°C, na presença de 5 µg/mL de tripsina, pois o cultivo *in vitro* do rotavírus é dependente do tratamento com tripsina, visto que o produto da clivagem da proteína VP4 em VP5 e VP8 resulta no aumento da infecciosidade viral. Posteriormente, foi inoculado 1 mL desta suspensão viral, e incubou-se durante 1 h, a 37°C, em estufa de CO₂, para permitir a adsorção e a penetração viral e, então, o inóculo foi retirado por sucção a vácuo e 20 mL do meio MEM sem SFB e acrescido de 5 µg/mL de tripsina foram adicionados. A incubação foi feita nas mesmas condições acima relatadas. O ECP foi monitorado por microscópio invertido a cada 12 h (ciclo de replicação do rotavírus). Quando o tapete celular se mostrou totalmente infectado pelo vírus, o frasco foi congelado a -80°C e descongelado a 37°C por 3X, para o rompimento total das células e liberação das partículas virais. A suspensão viral foi aliquoteada em tubos estéreis e armazenados a -80°C até sua utilização.

4.2.4.3 Vírus Sincicial Respiratório A-2

A suspensão viral estoque do vírus respiratório sincicial foi preparada como descrito por Hallak et al. (2000). A suspensão viral foi inoculada em um frasco de cultura de 150 cm² de área, contendo uma monocamada de células HEp-2, apresentando 50-70% de confluência, cultivada em 20 mL de meio DMEM, suplementado com 10% de SFB, 1% de glutamina e antibióticos/antifúngico, tendo sido tripsinizadas 24 h antes da infecção. O meio de cultura DMEM foi aspirado e a monocamada celular foi lavada 3X com DMEM; após, foi inoculado 1 mL da suspensão viral e incubou-se, durante 3 h, a 37°C, em estufa de CO₂, para permitir a adsorção e a penetração viral e, então, o inóculo foi retirado, a monocamada foi lavada 1X com meio DMEM. Posteriormente, foram adicionados 20 mL do meio DMEM suplementado com 2% de SFB, 1% de glutamina e antibióticos/antifúngico e as células foram incubadas por 48 h a 37°C, em estufa de CO₂. Após este período, as células infectadas foram liberadas por raspagem e coletadas junto com o meio infectado. A suspensão celular foi centrifugada a 1000 Xg por 5 min. Após centrifugação foram mantidos 5 mL do sobrenadante junto com o sedimento, sendo o restante do sobrenadante descartado. O sedimento+sobrenadante foi vortexado durante 3 s (3X), para o rompimento total das células e liberação das partículas virais, e novamente centrifugado a 1000 Xg por 10 min. O sobrenadante obtido foi coletado e foi adicionado o mesmo volume de sacarose 50% (GUPTA et al., 1996). O fluido sobrenadante foi aliquotado em tubos estéreis e armazenados a -80°C até sua utilização.

4.2.5 Determinação do título infeccioso viral

Antes de se iniciar os testes da potencial atividade antiviral dos compostos foi essencial obter inóculos virais com infecciosidade conhecida. A infecciosidade dos vírus pode usualmente ser determinada como unidades formadoras de placas (PFU) ou como unidades formadoras de focos (FFU), dependendo da metodologia utilizada.

Alguns conceitos básicos devem ser considerados antes de se iniciar a descrição do método propriamente dito. Segundo Burleson, Chambers e Wiedbrauk (1992):

-Infecciosidade viral é a capacidade que uma partícula viral possui de

invadir uma célula e parasitá-la para se replicar;

-**Título** é o número de partículas virais infecciosas por unidade de volume;

-**Efeito citopático** (ECP) é o conjunto de todas as lesões provocadas por uma partícula viral nas células onde ela se multiplica. A maioria dos vírus provoca modificações celulares específicas e fáceis de observar ao microscópio. No caso do HSV, o ECP se expressa pelo aparecimento de células arredondadas, brilhantes, freqüentemente ligadas umas às outras por prolongamentos citoplasmáticos, formando os focos. Esses focos têm o aspecto característico de cachos de uva, que se estendem pelo tapete celular, desorganizando-o (GIRARD; HIRTH, 1989). O ECP do rotavírus é caracterizado por células arredondadas e granulação. Eventualmente, as células se destacam, desintegrando a monocamada (WIEDBRAUK; SHERYL, 1992). O ECP do RSV é caracterizado pela fusão das membranas das células vizinhas, resultado em células fusionadas (sincício) caracterizadas pela presença de múltiplos núcleos (XU et al., 2004).

4.2.5.1 Titulação dos HSV

O título infeccioso dos estoques virais do HSV foram determinado através do método de contagem das placas de lise, descrita por Burleson, Chambers e Wiedbrauk (1992) e Kingchington et al. (1995): células VERO ou GMK AH1, em uma densidade aproximada de 2×10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 24 cavidades com meio MEM, suplementado com 5% de SFB, até atingirem confluência (aproximadamente 24 h). A suspensão viral foi diluída em forma seriada (razão 1:10) em meio MEM sem SFB e com antibióticos/antifúngico. O meio foi aspirado e 200 µl das diferentes diluições foram adicionadas em cada cavidade (três réplicas para cada diluição). As placas foram incubadas em estufa de CO₂, durante 60 min e, a cada 15 min, foram suavemente agitadas para uma melhor distribuição da amostra. Após esse tempo, o inóculo foi removido e foi adicionado 1,0 mL da seguinte solução para as células VERO: meio MEM 2X + solução aquosa a 0,8 % de carboximetilcelulose, na proporção 1:1, previamente esterilizada, e para as células GMK AH1: meio MEM + 1% de metilcelulose em solução de Hanks, na proporção 1:1, previamente esterilizada. As placas foram, então, incubadas a 37°C, durante 72 h, em estufa de CO₂. Após este período, o meio foi retirado e as células foram fixadas e coradas pela adição dos corantes preto de naftaleno (200 µl) ou cristal violeta (1 mL). As células VERO foram incubadas com o corante preto de naftaleno,

durante 30 min, a temperatura ambiente. Após este período, o corante foi aspirado e as placas foram deixadas para secar ao ambiente. Para as células GMK AH1, logo após a sua adição, o corante cristal violeta foi aspirado, a monocamada foi lavada 3X com água destilada e as placas foram deixadas para secar ao ambiente. Para calcular o título foram escolhidas as diluições que apresentaram um número discreto de focos de infecção, caracterizados por áreas claras de lise celular, chamadas de placas, que foram contadas com ajuda de microscópio estereoscópio. Segundo Burleson, Chambers e Wiedbrauk (1992), o título infeccioso é expresso através do número de unidades formadoras de placas/mL (PFU/mL) e, portanto, de partículas virais, já que teoricamente cada placa é iniciada pela infecção de uma única partícula viral infectante. O título viral foi calculado através da fórmula: nº de placas formadas X recíproca da diluição X recíproca do volume.

4.2.5.2 Titulação do rotavírus SA11

Os títulos infecciosos dos estoques virais produzidos foram determinados através do ensaio de imunofluorescência indireta, conforme descrito por Barardi et al. (1998): células MA104 foram cultivadas na concentração de 5×10^4 células/mL em meio de crescimento durante 24 h em placas de 8 cavidades estéreis (Lab Tek, NUNC), especiais para este tipo de ensaio, até a formação de um tapete confluyente. A suspensão viral foi diluída seriadamente de 10^{-1} a 10^{-7} em meio MEM, acrescido de

5 µg/mL de tripsina, e distribuída nas placas. Foram realizados também controles negativos contendo somente o meio MEM e a monocamada de células. Para a infecção viral, as células contidas em cada cavidade foram semeadas com 100 µl de cada diluição viral. As placas foram incubadas, durante 60 min, a 37°C, em estufa de CO₂ para que ocorresse a adsorção dos vírus às células. Após esse período, o inóculo foi removido e, em seu lugar, foram adicionados 300 µl de meio MEM. As células foram, então, incubadas durante 24 h, a 37°C, 5% de CO₂. Após o período de incubação, o meio foi removido das placas. Em seguida, as células foram fixadas pela adição de 300 µl de metanol a -20°C e mantidas, durante 5 min, a temperatura ambiente. Esta etapa foi repetida para garantir a fixação adequada das células e, posteriormente, as placas foram secas ao ar. As células foram reidratadas com 300 µl de PBS, que foi retirado após 5 min. A próxima incubação foi realizada com

300 µl da solução bloqueadora (PBS, soroalbumina bovina a 1% e Tween 20 a 0,05%), durante 15 min. Posteriormente, em cada cavidade foram adicionados 100 µl de sobrenadante do hibridoma contendo o anticorpo monoclonal anti-rotavírus M60, diluído 1:2 em solução bloqueadora; as placas foram incubadas, durante 12 h, a 4°C. Após, as células foram lavadas 3X com solução bloqueadora e, finalmente, incubadas, durante 15 min, a 37°C, com 100 µL do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a fluoresceína (FITC, Sigma), diluído 1:100. As células foram novamente lavadas 3X com solução bloqueadora. Deixou-se secar e adicionou-se 10 µL de meio de montagem [PBS 40%, glicerol 50%, formalina 5%, NaCl 5% e DABCO (1,4-diazabicyclo-2,2,2-octano) 2,5%; pH 8,6]. As placas foram recobertas com lamínulas para a realização da leitura em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40), com um filtro de excitação verde (515-560 nm), 200X. O título viral foi determinado através da contagem do número de células fluorescentes na maior diluição viral, sendo expresso em unidades formadoras de focos/mL (FFU/mL).

4.2.5.3 Titulação do RSV

O título infeccioso do estoque viral do RSV foi determinado através do método de contagem das placas de lise: células HEp-2, em uma densidade aproximada de 2×10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 12 cavidades com meio DMEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de glutamina até atingirem confluência (aproximadamente 24 h). A suspensão viral foi diluída em forma seriada (razão 1:10) em meio DMEM sem SFB e com antibióticos/antifúngico. O meio foi aspirado e 200 µl das diferentes diluições foram adicionadas em cada cavidade (duas réplicas para cada diluição). As placas foram incubadas em estufa de CO₂, durante 2 h e, a cada 30 min, foram suavemente agitadas para uma melhor distribuição da amostra. Após esse tempo, o inóculo foi removido e foi adicionado 1,0 mL da seguinte solução: meio DMEM, suplementado com 2% de SFB e 1% de glutamina, + 1,0% de metilcelulose em solução de Hanks, na proporção 1:1, previamente esterilizada. As placas foram, então, incubadas a 37°C, durante 72 h, em estufa de CO₂. Após este período, o meio foi retirado e as células foram fixadas e coradas pela adição de 1 mL do corante cristal violeta. O corante foi aspirado, a monocamada foi lavada 3X com água destilada e as placas foram deixadas para secar ao ambiente. Para calcular o

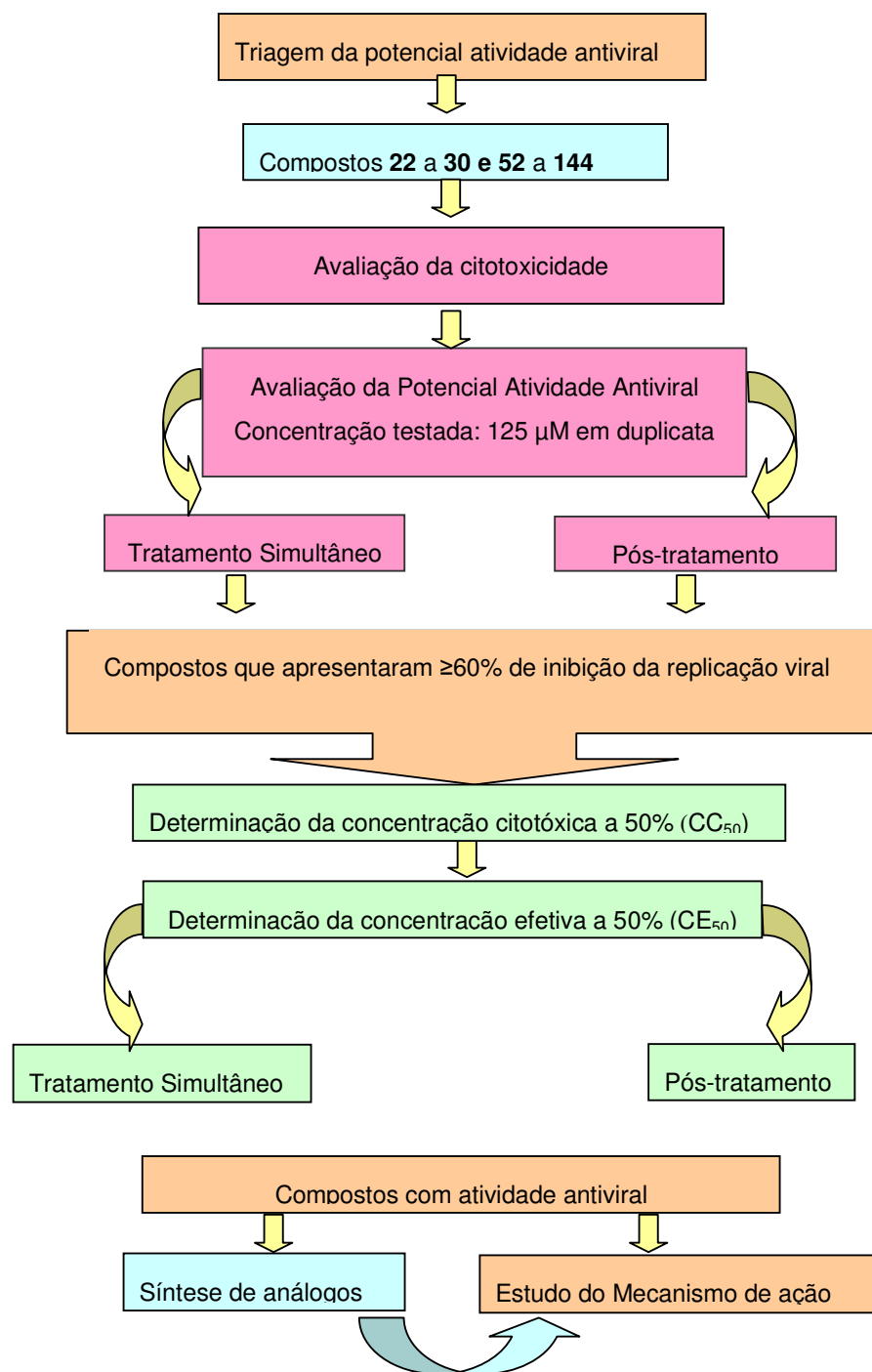
título foram escolhidas as diluições que apresentaram um número discreto de focos de infecção, caracterizados por áreas roseadas claras que correspondem aos sincícios, que foram contadas com ajuda de microscópio. O título infeccioso foi expresso através do número de unidades formadoras de placas/mL (PFU/mL).

4.2.6 Triagem da potencial atividade antiviral realizado no Laboratório de Virologia Aplicada/UFSC

Com o intuito de identificar novos compostos com atividade antiviral foi realizado uma triagem da potencial atividade antiviral dos compostos acima descritos. No processo de triagem realizado no Laboratório de Virologia Aplicada/UFSC, as sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona (**22** a **30**) e os compostos (**52**) a (**144**) tiveram a sua citotoxicidade avaliada, e foram testados em relação à sua potencial atividade antiviral contra os vírus rotavírus SA11 e o HSV-1, cepas KOS e 29R, através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium, conforme o Esquema 6.

4.2.6.1 Avaliação da citotoxicidade, através do ensaio do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-difeniltetrazólio]

Técnica: uma suspensão de células VERO ou MA104, contendo aproximadamente 2×10^5 células/mL, foi obtida através da tripsinização de um frasco de cultura celular. Essa suspensão foi distribuída em uma placa de 96 cavidades (100 µl por cavidade). Após 24 h de incubação, a 37°C, em estufa de CO₂, o tapete celular estava confluyente, o meio da placa foi descartado por aspiração e foram adicionados 200 µl de cada composto, na concentração de 250 µM, dissolvidos em meio MEM sem SFB. Cada composto foi testado em duplicata. Após, as placas foram novamente incubadas, por 3 e 4 dias, respectivamente, para as células MA104 e VERO. Posteriormente, foi aspirado todo o meio e adicionou-se 50 µL de MTT (Sigma, 1 mg/mL), diluído em meio MEM, em todas as cavidades, e as placas foram incubadas por mais 4 h, nas mesmas condições. Após o período de incubação, foi retirado o meio + MTT de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células e foram adicionados 100 µl de DMSO (Nuclear), em todas as cavidades, para solubilizar a formazana. Após, as placas foram agitadas, levemente, para que toda a formazana fosse solubilizada e lidas a 540 nm em um



Esquema 6: Triagem da potencial atividade antiviral dos compostos sintéticos (22 a 30) e (52) a (144), através do ensaio do MTT.

espectrofotômetro (Bio-Tek, EL_x 800). As porcentagens de viabilidade celular foram calculadas em relação aos controles celulares.

4.2.6.2 Avaliação da potencial atividade antiviral, através do ensaio do MTT

Procedimento 1 - tratamento simultâneo com os compostos + vírus: células VERO ou MA104 foram cultivadas em placas de 96 cavidades (2×10^5 células/mL) até confluência (24 h). O meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100 µL de cada composto, na concentração de 250 µM, dissolvidos em meio MEM sem SFB, e 100 µL da suspensão viral dos vírus (HSV-1 cepas KOS e 29 R ou RV-SA11), com MOI de 0,5. Foram realizados controles virais (100 µL da suspensão viral + 100 µL de meio MEM), controles celulares (200 µL de meio MEM) e controles positivos de inibição do HSV-1 (100 µL de suspensão viral + 100 µL de solução de aciclovir 10 µM); o rotavírus não dispõe de controle (+) de inibição. Cada composto foi testado em duplicata, assim como o controle celular, o controle viral e o controle positivo. Em todos os experimentos com o rotavírus, o meio MEM foi acrescido de 5 µg/mL de tripsina. As placas foram incubadas a 37°C, em estufa de CO₂, durante 3 dias para o RV-SA11 e 4 dias para o HSV-1. Após o período de incubação, foi aspirado todo o meio e foram adicionados 50 µL da solução do MTT (Sigma) (1 mg/mL em meio MEM), em todas as cavidades da placa, e essa foi incubada por 4 h. Após o período de incubação, foi retirado o meio + MTT de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células e foram adicionados 100 µL de DMSO (Nuclear), em todas as cavidades, para solubilizar a formazana. Após, as placas foram agitadas, levemente, para que toda a formazana fosse solubilizada e lidas a 540 nm num espectrofotômetro (Bio-Tek, ELx 800).

As porcentagens de inibição foram calculadas através da fórmula:

$$(A)_{\text{EXP}} - (A)_{\text{CV}} / (A)_{\text{CC}} - (A)_{\text{CV}} \times 100\%$$

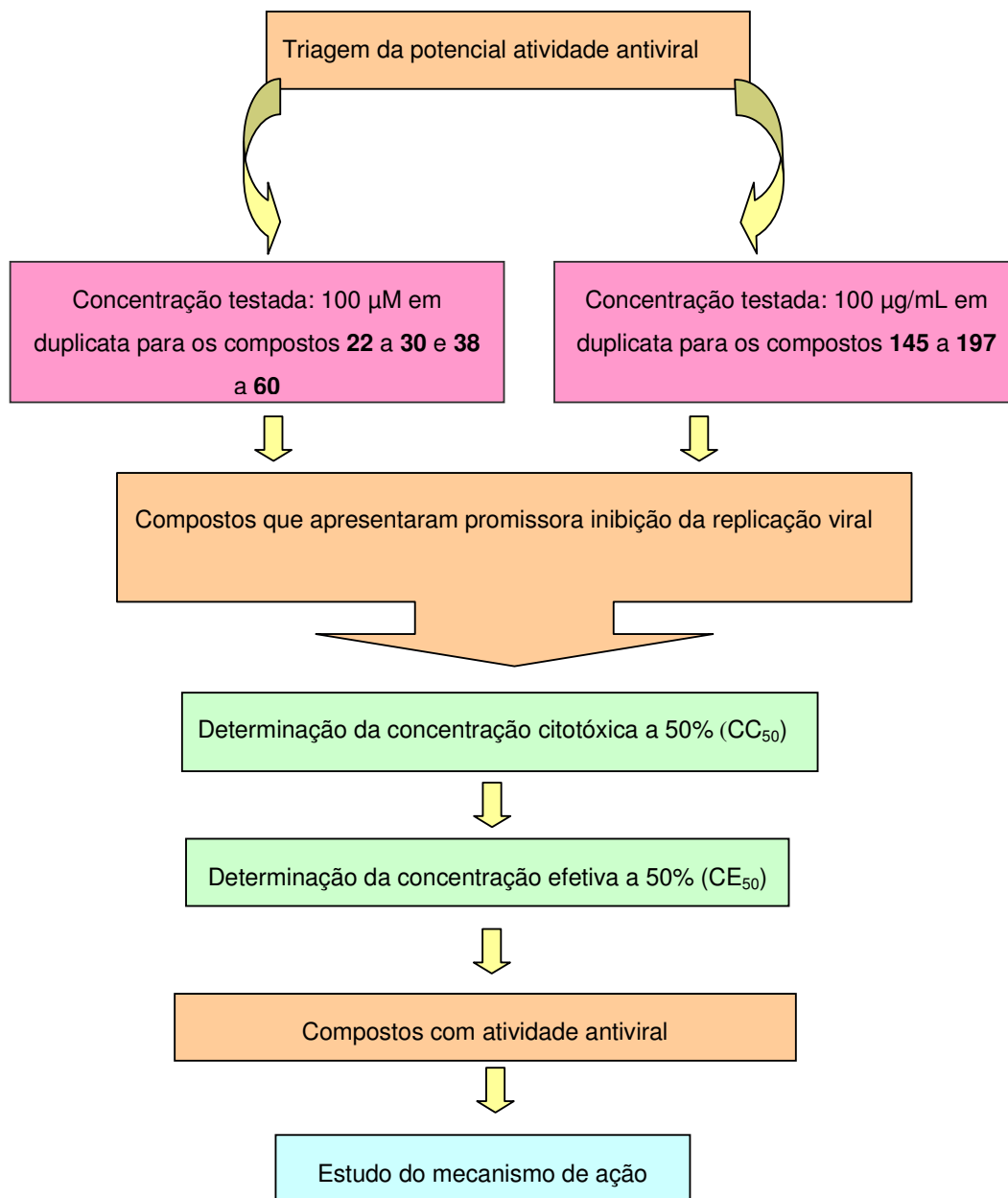
Onde: (A)_{EXP}, (A)_{CV} e (A)_{CC} indicam, respectivamente, as absorbâncias das cavidades com (compostos + vírus), (controle viral) e (controle celular).

Procedimento 2 - pós-tratamento das células infectadas com os compostos: células VERO ou MA104 foram cultivadas em placas de 96 cavidades (2×10^5 células/mL) até confluência (24 h). O meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100 µL da suspensão viral dos vírus (HSV-1 cepas KOS e 29 ou RV-SA11), com MOI de 0,5, que ficaram em contato com o tapete celular por 2 h.

Decorrido este período, a suspensão viral foi aspirada, as células foram lavadas com PBS para garantir a eliminação de todas as partículas virais que não foram adsorvidas e, logo após, foram adicionados 200 µL dos compostos, na concentração de 125 µM, dissolvidos em meio MEM sem SFB, 200 µl de meio MEM para o controle celular e para o controle viral e 200 µl de uma solução de aciclovir 10 µM (controle positivo de inibição do HSV-1); o rotavírus não dispõe de controle (+) de inibição. Cada composto foi testado em duplicata, assim como o controle celular, o controle viral e o controle positivo. Em todos os experimentos com o rotavírus, o meio MEM foi acrescido de 5 µg/mL de tripsina. As placas foram incubadas a 37°C, em estufa de CO₂, durante três dias para o RV-SA11 e quatro dias para o HSV-1. Após o período de incubação, foi aspirado todo o meio e foram adicionados 50 µl da solução do MTT (Sigma) (1 mg/mL em meio MEM), em todas as cavidades da placa, e essa foi incubada por 4 h. Após o período de incubação, foi retirado o meio + MTT de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células e foram adicionados 100 µl de DMSO (Nuclear), em todas as cavidades, para solubilizar a formazana. Após, as placas foram agitadas, levemente, para que toda a formazana fosse solubilizada e lidas a 540 nm num espectrofotômetro (Bio-Tek, EL_x 800). As porcentagens de inibição foram calculadas da mesma forma que no item anterior.

4.2.7 Triagem da potencial atividade realizada no Departamento de Virologia Clínica da Universidade de Göteborg/Suécia

No processo de triagem realizado no Departamento de Virologia Clínica da Universidade de Göteborg/Suécia, os compostos (**145** a **197**), em uma única concentração de 100 µg/mL, foram avaliados em relação à sua potencial atividade antiviral contra os vírus HSV-2 cepa 333 e RSV cepa A-2, através do método de redução de formação de placa de lise. As sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona (**22** a **30**), as sulfonamidas derivadas da quinolina (**38** a **48**) e os sulfonatos (**49**) e (**50**) foram avaliados em relação à sua potencial atividade antiviral contra os vírus HSV-2 cepa 333 e RSV cepa A-2 através da mesma metodologia, utilizando uma única concentração de 100 µM, conforme Esquema 7.



Esquema 7: Triagem da potencial atividade antiviral dos compostos sintéticos (22 a 30), (38) a (50) e (145 a 197), através do método de redução de formação de placa de lise

4.2.7.1 Avaliação da potencial atividade antiviral, através do método de redução de formação de placa de lise (NYBERG et al., 2004).

Células GMK AH1, em uma densidade aproximada de 2×10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 12 cavidades com meio EMEM, suplementado com 5% de SFB e 1% de antibióticos/antifúngico até atingirem confluência. Foram colocados 445 μ L de EMEM em cada cavidade das placas de 24 e foram adicionados 5 μ L dos compostos (**22 a 30**), (**38 a 50**) na concentração de 10 mM ou 5 μ L dos compostos (**145 a 197**), na concentração de 10 mg/mL, correspondendo a uma diluição final de 100 μ M e 100 μ g/mL, respectivamente. Na sequência foram adicionados 50 μ L da suspensão viral contendo aproximadamente 200 PFU HSV-2, a placa foi levemente homogeneizada e incubada, por 10 min, a temperatura ambiente. Decorrido este período, a monocamada de células foi lavada uma vez com EMEM. O meio foi retirado e foram adicionados 500 μ L da mistura composto+suspensão viral. As placas foram, então, incubadas a 37°C, durante 2 h, em estufa de CO₂. Após esse tempo, foram adicionados 1,5 mL de meio EMEM + metilcelulose a 1% em solução de Hanks, suplementado com 2% de SFB e 1% de antibióticos. As placas foram incubadas a 37°C durante 48 h. Após esse período, o meio foi retirado e as células foram fixadas e coradas pela adição de 1 mL do corante cristal violeta. O corante foi aspirado, a monocamada foi lavada 3X com água destilada e as placas foram deixadas para secar ao ambiente. As placas de lise foram contadas em microscópio. A percentagem de inibição da replicação viral foi calculada pela seguinte fórmula: % de inibição da replicação viral = $100 - (\text{Número de placas composto} \times 100) / \text{número de placas no controle viral}$

Para o RSV, foi usado o mesmo método, sendo que neste caso as células utilizadas foram as HEp-2, cultivadas em DMEM, suplementado com 10% de SFB, 1% de glutamina e 1% de antibióticos/antifúngico. As placas foram incubadas a 37°C, durante 72 h, antes de serem fixadas com o corante cristal violeta.

4.2.8 Determinação da concentração citotóxica a 50% (CC₅₀)

Os compostos (**22 a 30**) e (**52 a 144**), que apresentaram porcentagens de inibição da replicação viral $\geq 60\%$, quando da realização dos procedimentos 1 e 2 do item **4.2.6.2**, foram ensaiados para a determinação das suas concentrações citotóxicas a 50% (CC₅₀), que foi realizada conforme descrito no item **4.2.6.1**, porém com a adição dos compostos diluídos seriadamente em meio MEM (razão 1:2). A

CC₅₀ de cada composto-teste foi calculada a partir das porcentagens de células viáveis em relação aos controles celulares, por análise de regressão.

Para avaliar a viabilidade das células GMK AH1 e HEp-2 perante aos compostos (**22 a 30**), (**38 a 50**) e (**145 a 197**), que apresentaram promissora atividade antiviral, foi utilizado o ensaio do MTS, Cell Titer96 (Promega, Madison, WI, USA) conforme metodologia descrita abaixo, de acordo com as instruções do fabricante:

Uma suspensão de células GMK AH1 ou HEp-2, contendo aproximadamente 2×10^5 células/mL, foi obtida através da tripsinização de um frasco de cultura celular. Essa suspensão foi distribuída em uma placa de 96 cavidades (100 µl por cavidade). Após 24 h de incubação, a 37°C, em estufa de CO₂, o tapete celular estava confluyente, o meio da placa foi descartado, o tapete celular foi lavado uma vez com meio EMEM ou DMEM e foram adicionados 100 µl de cada composto diluído seriadamente em meio EMEM sem SFB (GMK AH1) ou DMEM suplementado com 2% de SFB (HEp-2), razão 1:2. Cada composto foi testado em duplicata. Após, as placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂, por 24 h. Posteriormente, foram adicionados 20 µL da solução aquosa de MTS (Cell Titer96 - Promega, Madison, WI, USA), e as placas foram incubadas por mais 4 h, nas mesmas condições. Após o período de incubação, as placas foram agitadas levemente e lidas a 490-560 nm em espectrofotômetro (Organon Teknika, Microwell System). A CC₅₀ de cada composto foi calculada a partir das porcentagens de células viáveis em relação aos controles celulares, por análise de regressão.

4.2.9 Determinação da concentração efetiva a 50% (CE₅₀)

A- Ensaio do MTT

A concentração efetiva a 50% (CE₅₀) dos compostos (**22 a 30**) e (**52 a 144**), que apresentaram uma porcentagem de inibição da replicação viral $\geq 60\%$, foi realizada da mesma forma que o item **4.2.6.2**, porém com a adição dos compostos diluídos seriadamente em meio MEM (razão 1:2) a partir da CC₅₀ determinada no item **4.2.8**. A CE₅₀ dos compostos foi calculada a partir das porcentagens médias de inibição da replicação viral, por análise de regressão. A partir dos valores de CC₅₀ e de CE₅₀, foi possível calcular o índice de seletividade ($IS = CC_{50} / CE_{50}$), que indica quão promissora é a atividade antiviral do composto em questão.

B- Método de redução de formação de placa de lise

A CE_{50} dos compostos (**22 a 30**), (**38 a 50**) e (**145 a 197**), que apresentaram promissora atividade antiviral, foi realizada da mesma forma que o item **4.2.7.1**, porém com a adição dos compostos diluídos seriadamente em meio de cultura e com algumas modificações no método de redução de formação de placa de lise para os diferentes grupos de compostos, conforme o Quadro 2.

Quadro 2: Etapas do método de redução de formação de placa de lise incluindo as modificações utilizadas para a determinação da CE_{50} dos compostos (**22 a 30**), (**38 a 50**) e (**145 a 197**) em relação ao vírus HSV-2 cepa 333.

Método de redução de formação de placa de lise	
Compostos (22 a 30) e (38 a 50)	Compostos (145 a 197)
1. Lavar uma vez a monocamada de células GMK AH1 com EMEM + 1% de antibióticos/antifúngicos.	1. Colocar, em uma placa de diluição, 1 mL das diferentes concentrações dos compostos, (100 a 0 µg/mL), diluídos seriadamente (razão 1:5) em meio EMEM + 1% de antibióticos/antifúngicos.
2. Adicionar 500 µL da suspensão viral contendo aproximadamente 100 PFU do HSV-2 cepa 333.	2. Adicionar 100 µL da suspensão viral contendo aproximadamente 200 PFU do HSV-2 cepa 333. Homogeneizar e incubar 10 min, a temperatura ambiente.
3. Incubar a 37°C, durante 2 h, em estufa de CO ₂ .	3. Lavar uma vez a monocamada de células GMK AH1 com EMEM + 1% de antibióticos/antifúngicos.
4. Retirar a suspensão viral e lavar uma vez a monocamada de células com EMEM + 1% de antibióticos/antifúngicos.	4. Adicionar 500 µL de cada mistura composto + suspensão viral em duas cavidades, obtendo-se duas réplicas de cada concentração.
5. Adicionar 1mL das diferentes concentrações dos compostos, (100 a 0 µM), diluídos seriadamente (razão 1:2) em meio EMEM + metilcelulose 1% em solução de Hanks (1:1), suplementado com 2% de SFB e 1% de antibióticos/antifúngicos, em duas cavidades, obtendo-se duas réplicas de cada concentração.	5. Incubar a 37°C, durante 2 h, em estufa de CO ₂ Retirar a mistura composto+ suspensão viral e lavar uma vez a monocamada de células com EMEM + 1% de antibióticos/antifúngicos.
6. Incubar a 37°C, em estufa de CO ₂ , durante 48 h.	6. Adicionar 1mL de meio EMEM + metilcelulose 1% em solução de Hanks (1:1), suplementado com 2% de SFB e 1% de antibióticos/antifúngicos
7. Retirar o meio, fixar e corar as células com o corante cristal violeta.	7. Incubar a 37°C, em estufa de CO ₂ durante 48 h. 8. Retirar o meio, fixar e corar as células com o corante cristal violeta.

Para o RSV, foi usado o mesmo método, sendo que neste caso as células utilizadas foram as HEp-2, cultivadas em DMEM, suplementado com 10% de SFB, 1% de glutamina e 1% de antibióticos/antifúngico. As placas foram incubadas a 37°C, durante 72 h, antes de serem fixadas com o corante cristal violeta.

4.2.10 Ação virucida (EKBLAD et al., 2006)

Os compostos foram diluídos seriadamente em meio EMEM sem soro (para o HSV) ou DMEM suplementado com 2% de SFB (para o RSV) a partir de 200 µg/mL (razão 1:5). A mistura de 50 µL da suspensão viral contendo 4×10^4 PFU e 50 µL das diferentes diluições dos compostos ou 50 µL de EMEM ou DMEM (controle viral) foram gentilmente homogeneizadas e incubadas por 20 min a 37°C em banho-maria. Decorrido este período, foi realizada a diluição da mistura a fim de obter a concentração não inibitória dos compostos (1:500) em um volume final de 1 mL. A monocamada de células foi lavada 2 X com meio de cultura. O meio foi retirado e foram adicionados 500 µL de cada diluição em duas cavidades, obtendo-se duas réplicas de cada concentração. As placas foram, então, incubadas a 37°C, durante 1 h, em estufa de CO₂. Após esse tempo, as diluições foram retiradas, a monocamada foi lavada 1X com 1 mL de meio de cultura. Posteriormente, foi adicionado 1,5 mL de meio EMEM + 1% metilcelulose preparada em solução de Hanks, suplementado com 1% de antibióticos para o HSV e 1,5 mL de meio DMEM + metilcelulose 1% em solução de Hanks (1:1), suplementado com 2% de SFB, 1% de glutamina e 1% de antibióticos para o RSV. As placas foram incubadas a 37°C durante 48 h para o HSV-2 e 72 h para o HSV-1 e o RSV. Após esse período, o meio foi retirado e as células foram fixadas e coradas pela adição de 1 mL do corante cristal violeta. O corante foi aspirado, a monocamada foi lavada 3X com água destilada e as placas foram deixadas para secar ao ambiente. As placas de lise foram contadas com ajuda de microscópio.

4.2.11 Estudo do mecanismo de ação antiviral:

4.2.11.1 Efeito do tempo de adição dos compostos no ciclo de replicação do HSV-1 cepa 29R/resistente ao aciclovir

A atividade antiviral do composto foi avaliada em vários períodos de tempo, de acordo com a técnica descrita por Carlucci et al. (1999), com algumas

modificações.

Células VERO, em uma densidade aproximada de 2×10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 24 cavidades com meio MEM, suplementado com 5% de SFB e 1% de antibióticos/antifúngico até atingirem confluência. Diferentes tratamentos foram então realizados:

- Pré-tratamento - 3 h antes da infecção: O composto foi diluído a 125 μ M em meio MEM + 1% de antibióticos/antifúngico e colocado em contato com o tapete celular. Após 3 h de incubação em estufa de CO₂, esse composto foi retirado e uma suspensão viral de aproximadamente 100 PFU foi adicionada; a placa foi incubada por mais 1 h. A suspensão viral foi então aspirada e 500 μ L de meio MEM 2X + 0,8% de carboximetilcelulose (razão 1:1) foram adicionados cuidadosamente. A placa foi então incubada em estufa de CO₂, a 37°C, por 72 h. Após esse período, a placa foi tratada conforme procedimento padrão descrito abaixo.
- Tratamento simultâneo (t_0): O composto diluído a 125 μ M em meio MEM + 1% de antibióticos/antifúngico foi adicionado às células juntamente com uma suspensão viral (aproximadamente 100 PFU). Após suave agitação, a placa foi incubada por 1 h, em estufa de CO₂, a 37°C. Posteriormente, essa mistura foi aspirada e 500 μ L de meio MEM 2X + 0,8% de carboximetilcelulose (razão 1:1) foram adicionados cuidadosamente. A placa foi então incubada estufa de CO₂, a 37°C, por 72 h, e após a placa foi tratada conforme procedimento padrão descrito abaixo.
- Pós-Tratamento: O tapete celular confluyente foi infectado com 400 μ L de suspensão viral (100 PFU). Uma hora após a infecção, a suspensão viral foi retirada e as células tratadas com o composto a 125 μ M diluídos em meio MEM 2X + 0,8% de carboximetilcelulose (razão 1:1) para o tempo de 1 h (t_1); a placa foi então incubada em estufa de CO₂, a 37°C, até completar o período de 72 h.
- Para os demais tempos, os poços receberam somente MEM 2X + 0,8% de carboximetilcelulose (razão 1:1) e a placa foi incubada em estufa de CO₂, a 37°C. Nos períodos subseqüentes 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 24 h após a infecção, esse meio foi aspirado e os poços foram tratados com o composto diluído a 125 μ M em MEM 2X + 0,8% de carboximetilcelulose (razão 1:1) e as

placas foram incubadas em estufa de CO₂, a 37°C, até completar o período de 72 h.

- Procedimento padrão: após 72 h de incubação, o meio foi aspirado e 200µL de preto de naftaleno foram adicionados a cada cavidade. Após 30 min a temperatura ambiente, o corante foi aspirado e as placas foram colocadas para secar. As placas de lise foram contadas com ajuda de microscópio.

4.2.11.2 Avaliação da expressão das proteínas virais

A avaliação da expressão das proteínas virais foi conduzida através de um ensaio do tipo ELISA, segundo procedimento descrito por Olofsson et al. (1999) e por *Western blot*, segundo procedimento descrito por Kuo et al. (2001), com algumas modificações.

A- ELISA

Células GMK AH1, em uma densidade aproximada de 2×10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 96 cavidades com meio EMEM, suplementado com 5% de SFB e 1% de antibióticos/antifúngico até atingirem confluência. O meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100 µl do composto diluído seriadamente em meio EMEM (razão 1:2) e 100 µl da suspensão viral do vírus HSV-1 cepa 29 R (MOI de 0,1). As placas foram incubadas a 37°C, por 24 h. Foram realizados controles virais (100 µl da suspensão viral + 100 µl de meio MEM). Subseqüentemente, as células foram lavadas uma vez com 200 µL de PBS e fixadas com 100 µL de glutaraldeído 0,25% em PBS durante 10 min, a temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas três vezes com 300 µL de PBS, foram bloqueadas com 200 µL de PBS contendo 2% de BSA, por 30 min, a temperatura ambiente. As células foram incubadas com 100 µL dos anticorpos monoclonais B1C1B4 (anti-gC-1), B11D8 (anti-gB) e B1E6A5 (anti-gE) (SJOGREN-JANSSON; JEANSSON, 1985,1990) diluídos 1:100 em PBS contendo 1% de BSA, a temperatura ambiente, durante 1 h. Após incubação, as placas foram lavadas três vezes com 300 µL de PBS e foram incubadas com 100 µL do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (1:1000) (Jackson ImmunoResearch Laboratory, UK) em PBS contendo 1% de BSA, a temperatura ambiente, durante 1 h. As placas foram lavadas três vezes com 300 µL de PBS e

incubadas com 200 µL de tampão dietanolamina contendo *p*-nitrofenilfosfato. Os valores de absorbâncias foram medidos a 405-690 nm em espectrofotômetro (Organon Teknika – Microwell System).

B- Western Blotting

Células VERO, em uma densidade aproximada de 6×10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 6 cavidades com meio MEM, suplementado com 5% de SFB e 1% de antibióticos/antifúngico até atingirem confluência. Após 24 h, as células foram incubadas ou não com 2 mL de uma suspensão viral do HSV-1 cepa 29R/resistente ao aciclovir com MOI de 0,1 por 1 h, a 37°C. Após, as células foram lavadas três vezes com 1 mL de PBS e foram adicionados 2 mL dos compostos potenciais inibidores da replicação viral, na concentração de 125 µM e 2 mL de meio MEM para os controles viral e celular. As placas foram incubadas a 37 °C, em estufa de CO₂, durante 18 h. Após este período, o meio foi retirado, as células foram lavadas duas vezes com 2 mL de PBS e foram adicionados 100 µL do tampão de lise [2% dodecil sulfato de sódio (SDS); 5% β-mercaptoetanol; 0,125 M Tris-HCl; 30% glicerol; 0,8% azul de bromofenol e 100 µg/mL fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF)]. As amostras foram transferidas para tubos de 1,4 mL, fervidas durante 5 min, a 100°C e centrifugadas a 10000 Xg por 10 min. Após a centrifugação, as amostras foram transferidas para novos tubos e armazenadas a -20°C. A determinação da concentração protéica foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). As proteínas (~50 µg) foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e SDS 0,1% (SDS-PAGE). Em seguida as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF® (Immobilon, Millipore®, Billerica, MA, USA) em tampão de transferência (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM e 20% de metanol), por 1 h, a 100 V e a 4°C. Na seqüência, as membranas foram bloqueadas por 1 h com 10% de leite desnatado em tampão TBS-T (Tris-base 20 mM, NaCl 137 mM, pH, Tween 20 0,05%), lavadas três vezes com TBS-T contendo 2% leite em pó e incubadas com o anticorpo policlonal de cabra contra a ICP27, proteína de fase α do HSV-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), e com o anticorpo monoclonal de camundongo contra a gD, proteína de fase γ do HSV-1, ambos diluídos 1:1000 em TBS-T contendo 2% de leite desnatado, a temperatura ambiente, durante 1 h. As membranas foram lavadas três vezes com TBS-T contendo 2% leite em pó e foram incubadas, durante 1 h, a temperatura

ambiente, com os anticorpos secundários: IgG anti-cabra diluído 1:5000 em TBS-T contendo 2% (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e anti-camundongo, diluído 1:1000 em TBS-T contendo 2% (SIGMA, St. Louis, MO, USA), respectivamente. Os anticorpos secundários estavam conjugados à peroxidase. As membranas foram lavadas três vezes com TBS-T contendo 2% leite em pó e uma vez com TBS. As proteínas específicas foram reveladas com DAB (diaminobenzeno) e peróxido de hidrogênio.

4.2.11.3 PCR em Tempo Real com sonda TaqMan®:

A técnica foi realizada segundo procedimentos descritos por Thi et al. (2006) e Namvar et al. (2005), com algumas modificações.

Células GMK AH1, em uma densidade aproximada de 5×10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 12 cavidades com meio EMEM, suplementado com 5% de SFB e 1% de antibióticos/antifúngico. Após confluência, as células foram lavadas uma vez com meio EMEM, foram infectadas ou não com 0,4 mL de uma suspensão viral do HSV-1 cepa 29R MOI 0,1 e foram incubadas por 2 h 37°C. Na seqüência, as células foram lavadas três vezes com 1 mL de meio EMEM e foram adicionados 1 mL do composto diluído seriadamente em meio EMEM (razão 1:2), 1 mL de meio para o controle viral e para o controle celular. Cada concentração do composto e os controles foram feitos em 2 replicatas. Após 24 h de incubação, o sobrenadante e as células foram coletados, sendo essas últimas por raspagem. O DNA foi extraído utilizando o sistema MagNA Pure LC Robot (Roche Diagnostics, Mannheim, BW, Germany) e o Kit MagNA Pure LC DNA Isolation, segundo as orientações do fabricante. O volume de entrada e de saída no processo de extração foi de 200 µl e 100 µl, respectivamente.

O par de iniciadores utilizado e a sonda fluorescente (Quadro 3) são específicos para amplificação de um segmento da glicoproteína gB do HSV-1 amplificando uma seqüência molde de 118 pares de base (NAMVAR et al., 2005). O volume final de reação de 50 µl corresponde a 25 µl do Master Mix Universal (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 10 µl da amostra de DNA não diluída ou diluída (diluição 1:10), 15 pmoles de ambos os iniciadores e 10 pmoles da sonda. Para a amplificação foi utilizado o equipamento ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O programa de temperaturas e ciclos para estes iniciadores e

sonda demandou um passo inicial de incubação por 2 min a 50 °C e de desnaturação a 95 °C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 15 seg a 95 °C, 1 min a 58 °C. Para cada reação de PCR foram utilizados controles negativos (10 µl de água ultrapurificada) e uma curva-padrão foi obtida, através do uso de 10 µl de cada diluição seriada (1:10) de um DNA de referência, obtido a partir de um plasmídeo recombinante (GenScript, Piscataway, NJ, USA) contendo 118 pares de bases do fragmento alvo da gB derivado do plasmídeo clonado em um vetor pUC57. Este DNA de referência foi previamente quantificado em termos do número de cópias de DNA, usando a mesma técnica de PCR em tempo real. A CE_{50} foi definida como a concentração do composto que reduz 50 % o número de cópias do DNA em relação ao controle viral não tratado. Foram feitas 2 replicatas em cada experimento para todas as amostras, controles e curva-padrão. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Quadro 3: Seqüência de iniciadores específicos usados para ampliação gênica de um segmento da gB do HSV-1 por PCR em tempo real.

Iniciador ou sonda	Seqüências	Fluoróforos	T _m (°C)
HSV-1 F	GCAGTTTACGTACAACCACATACAGC		59,9
HSV-1 R	AGCTTGCGGGCCTCGTT		60,5
Sonda 1	CGGCCCAACATATCGTTGACATGGC	5' FAM, 3' TAMRA	70,3

FAM = 6-carboxifluoresceína; TAMRA = 6-carboxitetrametilrodamina.

4.2.11.4 Efeito do composto-teste sobre a dispersão dos vírus célula A célula:

O método de redução do tamanho das placas de lise (NYBERG et al., 2004) e o ensaio do centro infeccioso (SPANDIDOS; GRAHAM, 1976) foram utilizados para investigar o efeito dos compostos sobre a atividade de dispersão célula-célula do HSV e do RSV, respectivamente.

A - Método de redução do tamanho das placas de lise:

Células GMK AH1, em uma densidade aproximada de 2×10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 12 cavidades com meio EMEM, suplementado com 5% de SFB e 1% de antibióticos/antifúngico até atingirem confluência. O meio foi aspirado e a monocamada de células foi lavada uma vez com EMEM + 1% de antibióticos/antifúngico. O meio foi retirado e foram adicionados 500 µL da

suspensão viral contendo aproximadamente 100 PFU e as placas foram incubadas a 37°C, durante 2 h, em estufa de CO₂. Após esse tempo, a suspensão viral foi aspirada, a monocamada de células foi lavada uma vez com EMEM + 1% de antibióticos/antifúngico e foram adicionadas as diferentes concentrações dos compostos diluídos seriadamente, razão 1:5 ou 1:2, em meio EMEM + metilcelulose 1% em solução de Hanks (1:1) e acrescidos de 1% de antibiótico/antifúngico. Após um período de incubação de 48 h para o HSV-2 e 72 h para o HSV-1, o meio foi retirado e as células foram fixadas e coradas pela adição de 1 mL do corante cristal violeta. O corante foi aspirado, a monocamada foi lavada 3X com água destilada e as placas foram deixadas para secar ao ambiente. A imagem de vinte placas de lise formadas na presença ou ausência (controle) dos compostos foram capturadas com o auxílio de uma câmera digital DC300 (Leica, Heerbrugg, Suíça), conectada a um microscópio Leitz-Wetzlar Diavert. A área da placa de lise foi determinada usando o software de imagem IM500 (Leica, Cambridge, UK). A CE₅₀ foi definida como a concentração que reduziu 50% a área das placas de lise quando comparada aos controles não tratados.

B - Ensaio do centro infeccioso

Foram utilizadas células HEp-2 cultivadas, em um frasco de cultura de 25 cm² em uma placa de 12 cavidades, com meio DMEM, suplementado com 10% de SFB, 1% de glutamina e 1% de antibióticos/antifúngico, tendo sido tripsinizadas 24 h antes da infecção.

Primeiramente, o meio de cultura DMEM foi aspirado do frasco de cultura a monocamada celular foi lavada 1X com DMEM, inoculada com 1 mL da suspensão viral do RSV + 2 mL de meio DMEM, suplementado com 2% de SFB, 1% de glutamina e 1% de antibióticos/antifúngico e incubada, durante 4 h, a 37°C, em estufa de CO₂. Após este período, o inóculo foi retirado e a monocamada de células foi lavada uma vez com 5 mL DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de glutamina e 1% de antibióticos/antifúngico; 1X com 5 mL de tampão citrato pH 3,0 aquecido a 37°C e novamente com 5 mL de meio DMEM (1 ou 2X) até restabelecer o pH neutro. Na sequência, a monocamada de células foi lavada uma vez com 5 mL de uma solução de EDTA 0,53 mM aquecido a 37°C. Esta solução foi retirada, adicionou-se novamente 5 mL de uma solução de EDTA 0,53 mM e o frasco de

cultura foi incubado, a 37°C, em estufa de CO₂ até que a monocamada descolasse totalmente da garrafa. Quando as células infectadas não descolaram com facilidade, a monocamada foi liberada por raspagem. A suspensão celular foi coletada em um tubo de 10 mL e foi centrifugada a 250 x *g*, por 5 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 5 mL de meio DMEM, suplementado com 2% de SFB, 1% de glutamina e 1% de antibióticos/antifúngico e novamente centrifugada a 250 x *g*, por 5 min, a 4°C. O sedimento foi ressuspensionado em 400 mL de meio DMEM, suplementado com 2% de SFB, 1% de glutamina e 1% de antibióticos/antifúngico. A suspensão celular infectada foi diluída seriadamente (razão 1:10) até 10⁻³ em meio DMEM, suplementado com 2% de SFB, 1% de glutamina e 1% de antibióticos/antifúngico na presença do composto (100 µg/mL) ou na ausência do mesmo (controle), obtendo-se um volume final de 1mL para cada diluição.

As diluições obtidas do controle e do composto foram utilizadas para infectar as células de uma placa de 12 cavidades: o meio foi aspirado e a monocamada de células foi lavada uma vez com DMEM, suplementado com 2% de SFB, 1% de glutamina e 1% de antibióticos/antifúngico. O meio foi retirado e foram adicionados 500 µL de cada diluição em duas cavidades, obtendo-se duas réplicas. As placas foram, então, incubadas a 37°C, em estufa de CO₂, durante 4 h. Após esse tempo, as diluições foram aspiradas e foi adicionado 1mL do composto a 100 µg/mL preparados em meio DMEM + metilcelulose 1% em solução de Hanks (1:1), suplementado com 2% de SFB, 1% de glutamina e 1% de antibióticos/antifúngico em todas as cavidade testes e somente meio DMEM + metilcelulose 1% em solução de Hanks (1:1), suplementado com 2% de SFB, 1% de glutamina e 1% de antibióticos/antifúngico nas cavidades controle . Após um período de incubação de 72 h, o meio foi retirado e as células foram fixadas e coradas pela adição de 1 mL do corante cristal violeta. O corante foi aspirado, a monocamada foi lavada 3X com água destilada e as placas foram deixadas para secar ao ambiente. Para avaliar os resultados foi escolhida a diluição que apresentou aproximadamente 100 PFU, que foram contados com ajuda de microscópio. Os resultados foram expressos em porcentagem correlacionando o número de PFU do composto com o controle.

4.2.11.5 Avaliação da inibição dos receptores celulares:

A - Purificação dos vírus

Vírions extracelulares do HSV e do RSV marcados radioativamente com metil[³H]timidina e [³⁵S]metionina/cisteína, respectivamente, foram purificados por ultracentrifugação utilizando um gradiente descontínuo de sacarose (KARGER; METTENLEITER, 1993; TRYBALA et al., 2000, MCDONALD et al., 2006).

A - 1 Vírus HSV

Os vírions extracelulares do HSV-1 cepa KOS 321 e HSV-2 cepa 333 marcados radioativamente com metil[³H]timidina foram obtidos através da seguinte técnica: as células GMK AH1, em uma densidade aproximada de 1×10^8 células/garrafa, foram cultivadas em garrafa de cultura giratórias (*roller bottles*) com meio EMEM + antibióticos/antifúngico, até atingirem confluência. Para cada cepa viral foram utilizadas 3 garrafas de culturas. Primeiramente, o meio de cultura EMEM foi aspirado da garrafa de cultura e a monocamada celular foi lavada 1X com EMEM; após, foi inoculado 2 mL de cada suspensão viral MOI de 3 mais 20 mL de meio EMEM + antibióticos/antifúngico e incubou-se, durante 1 h para o HSV-2 e 2 h para o HSV-1, a 37°C, com movimento circular. Após este período, o inóculo foi retirado e a monocamada de células foi lavada duas vezes com 12 mL de meio EMEM + antibióticos/antifúngico; o meio de cultura foi retirado, foram adicionados 40 mL de meio EMEM contendo 20 µCi/mL de metil[³H]timidina (PerkinElmer, Boston, MA) e a garrafa foi incubada, durante 48 h, a 37°C, com movimento circular. Após este período, a suspensão celular foi coletada em um tubo de 50 mL e centrifugada a 1000 Xg por 15 min, a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado e novamente centrifugado a 1000 Xg, por 5 min, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e foi submetido a ultracentrifugação. Os tubos da ultracentrifugação foram preenchidos lentamente, tarados e devidamente vedados. O material foi centrifugado a 28000 Xg, durante 2 h, utilizando o rotor Ti70 (Beckman Coulter, USA) e a centrífuga Beckman-Coulter Optima LE-80K, na programação início lento e parada lenta, sendo que o rotor foi previamente resfriado. Após este período, o sobrenadante foi removido, com auxílio de seringa de 20 mL e agulha longa, mantendo-se um pequeno volume do sobrenadante (~500 µL) sobre o sedimento obtido. O sedimento viral obtido foi mantido por 12 h, a 4°C. Posteriormente, este foi ressuspensionado gentilmente e foram

adicionados 9 mL de PBS gelado e o material foi mantido em banho de gelo. Os procedimentos na sequência foram realizados em ambiente a 4°C. Previamente, foram preparadas e esterilizadas as soluções de sacarose a 50%, 40% e 30% em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4 + EDTA 1 mM. O gradiente foi preparado em tubos de 20 mL (Beckman-Coulter): foram colocados 2 mL da solução de sacarose 50% no fundo do tubo, com auxílio de uma seringa de 5 mL e agulha 30x12, evitando escorrer a solução pelas paredes; sobre esta camada foi colocado lentamente 2 mL da solução de sacarose 40%, utilizando uma nova seringa, evitando que as mesmas se misturem e que também não escorra pelas paredes; após foram colocados 2 mL da solução de sacarose 30%, mantendo os mesmos cuidados. O sedimento viral, previamente ressuspensionado em PBS, foi aplicado cuidadosamente no topo do gradiente descontínuo e foi centrifugado a 70000 Xg (rotor SW 28.1, Beckman Coulter, USA) a 4°C, por 2 h, utilizando aceleração lenta e parada sem freio, para não perturbar o gradiente. Após a ultracentrifugação, ocorreu a formação de uma banda entre os gradientes 40 e 50%. Esta banda na interface entre 40/50% foi aspirada (~ 0,8 mL) utilizando a perfuração da lateral do tubo com uma agulha 25X6 + seringa de 1 mL. A banda obtida foi diluída com 13,5 mL de PBS gelado e centrifugada a 73000 Xg (rotor SW 28.1), a 4°C, durante 1 h e 30 min, utilizando aceleração lenta e parada sem freio. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado 2 X com 0,5 mL de PBS gelado. Após lavar, o sobrenadante foi novamente descartado e foi adicionado 0,5 mL de PBS gelado e o material foi mantido a 4°C, por 12 h. Após este período, foi adicionado 0,5 mL de uma solução de 0,2% BSA em PBS e o sedimento foi gentilmente ressuspensionado. A suspensão viral contendo os vírus purificados e radiomarcados foi alíquotada e guardada a -70°C. Para calcular a atividade específica, foi determinada a radioatividade, por cintilação em fase líquida (Beckman LS 1801, Fullerton, CA, USA), e foi determinada a infecciosidade, através do método de contagem das placas de lise.

A – 2 Vírus RSV

Os vírions extracelulares do RSV cepa A2 marcados radioativamente com ³⁵[S]metionina/cisteína foram obtidos através da seguinte técnica: as células HEp-2, em uma densidade aproximada de 1×10^8 células/garrafa, foram cultivadas em garrafa de cultura giratórias (*roller bottles*) com meio DMEM + 2% de SFB + 1% de

glutanima+ 1% de antibióticos/antifúngico, até atingirem confluência. Primeiramente, o meio de cultura DMEM foi aspirado da garrafa de cultura e a monocamada celular foi lavada 1 X com DMEM; após, foi inoculado 2,5 mL de cada suspensão viral + 20 mL DMEM + 2% de SFB + 1% de glutanima + 1% de antibióticos/antifúngico, e incubou-se, durante 18 h, a 37°C, com movimento circular. Após este período, o inóculo foi retirado e a monocamada de células foi lavada 1X com 12 mL de DMEM modificado sem metionina e sem cisteína + 2% de SFB + 1% de antibióticos/antifúngico; o meio de cultura foi retirado, foram adicionados 40 mL de meio DMEM sem metionina e sem cisteína + 2% de SFB + 1% de antibióticos/antifúngicos + 10% de DMEM não modificado, contendo 50 µCi/mL de [³⁵S]metionina/cisteína (TRAN35S-label, MP Biomedicals, Bélgica) e a garrafa foi incubada, durante 24 h, a 37°C, com movimento circular. Após este período, as células infectadas foram liberadas por raspagem e coletadas junto com o meio infectado. A suspensão celular+vírus foi turbilhonada durante 3 s (3X) na velocidade máxima e centrifugada a 1000 Xg por 10 min. O sobrenadante foi coletado, e centrifugado novamente a 4000 Xg por 5 min para remover os debris celulares. Esse sobrenadante foi coletado e foi submetido a ultracentrifugação.

Os procedimentos na sequência foram realizados em ambiente a 4°C. Previamente, foram preparadas e esterilizadas as soluções de sacarose a 50%, 40% e 30% em solução de Hanks. O gradiente foi preparado em tubos de 20 mL (Beckman-Coulter): foram colocados 2 mL da solução de sacarose 50% no fundo do tubo, com auxílio de uma seringa de 5 mL e agulha 30x12, evitando escorrer a solução pelas paredes; sobre esta camada foi colocado lentamente 2 mL da solução de sacarose 40%, utilizando uma nova seringa, evitando que as mesmas se misturem e que também não escorram pelas paredes; após foram colocados 2 mL da solução de sacarose 30%, mantendo os mesmos cuidados. O sobrenadante viral foi aplicado cuidadosamente no topo do gradiente descontínuo e foi centrifugado a 150000 Xg (rotor SW 28.1) a 4°C, por 18 h, utilizando aceleração lenta e parada sem freio, para não perturbar o gradiente. Após a ultracentrifugação, ocorreu a formação de bandas dispersas entre os gradientes. Assim, foi realizada a perfuração da lateral do tubo com uma agulha 25X6 + seringa de 1 mL e foram coletadas 6 diferentes frações de 1 mL cada. De cada fração foi retirado 50 µL e foi determinada o seu título, através método de contagem das placas de lise, a fim de identificar as frações

que contém os vírus RSV marcados radioativamente. As frações foram guardadas a -70°C até o momento do uso. Foi identificado que as frações 1 e 2 continham os vírus. Estas foram descongeladas, unidas e transferidas para um tubo concentrador de 1000 kD (Microsep, PallGelman Sciences, Sweden) e centrifugadas a 5000 Xg, a 4°C , por 5 min. Após centrifugação, obteve-se aproximadamente 100 μL do concentrado. A esse foram adicionados 700 μL de solução de Hanks e novamente centrifugado nas mesmas condições até obter aproximadamente 100 μL do concentrado. Os 100 μL do concentrado viral obtido foram ressuspensos e transferidos para um tubo. O tubo concentrador foi lavado com mais 100 μL de solução de Hanks, sendo esse volume também transferido para o tubo contendo o concentrado viral. Foi retirado uma alíquota e foi determinada a radioatividade, por cintilação em fase líquida.

B - Efeito dos compostos sobre a ligação dos vírions purificados às células

O efeito dos compostos sobre a ligação dos vírions purificados do RSV e do HSV às células HEp-2 ou às células GMK AH1, respectivamente, foi avaliado conforme descrito previamente (NYBERG et al., 2004).

Células GMK-AH1 ou HEp-2 foram cultivadas em placas de 24 cavidades e pré-resfriadas durante 30 min, a 4°C . Após este período, a monocamada de células foi lavada duas vezes com PBS-A (PBS suplementado com 1 mM CaCl_2 e 0,5 mM MgCl_2) gelado e foram bloqueadas com a solução de PBS-A acrescida de 1% de BSA, durante 1 h a 4°C . Posteriormente, 250 μL dos compostos diluídos seriadamente em PBS-A (razão 1:5) foram distribuídos em uma placa de 24 cavidades vazia e foram adicionados 10 μL ou 15 μL dos vírions do HSV ou do RSV marcados radioativamente, respectivamente. Esta placa foi incubada a 4°C , durante 15 min. Após 1 h de bloqueio a 4°C , as células foram lavadas 1X com PBS-A gelado, foram adicionados 240 μL da mistura vírus+composto e as placas foram incubadas sob moderada agitação a 4°C , durante 2 h. Na sequência, as células foram lavadas 3X com PBS-A, lisadas com 200 μL de uma solução de 5% de SDS em PBS-A e transferidas para os tubos de cintilação para a quantificação da radioatividade, por cintilação em fase líquida, após a adição de 3 mL do líquido de cintilação.

C - Isolamento das proteínas virais

As glicoproteínas B e C dos vírus HSV-1 cepa KOS 321 e do HSV-2 cepa 333 foram isoladas conforme descrito por Trybala et al. (2000).

As células GMK AH1, em uma densidade aproximada de 1×10^8 células/garrafa, foram cultivadas em garrafa de cultura giratórias (*roller bottles*) com meio EMEM + antibióticos/antifúngico, até atingirem confluência. Para cada cepa viral foram utilizadas 6 garrafas de culturas. Primeiramente, o meio de cultura EMEM foi aspirado da garrafa de cultura e a monocamada celular foi lavada 1 X com EMEM; após, foi inoculado 1 mL de cada suspensão viral + 20 mL de meio EMEM + antibióticos/antifúngico e incubou-se a 37°C, durante 2 h, com movimento circular. Após este período, o inóculo foi retirado, e adicionou-se 45 mL de meio EMEM + antibióticos/antifúngico e as garrafas foram incubadas, a 37°C, com movimento circular. O ECP foi monitorado por microscópio invertido a cada 24 h. Quando o tapete celular se mostrou totalmente infectado pelo vírus, os conteúdos das garrafas (células e meio de cultura) foram coletados em tubos de 50 mL e centrifugados a 2500 Xg por 10 min, a 4°C. Após a centrifugação, as células sedimentadas foram congeladas a -80°C e o sobrenadante foi ultracentrifugado 113000 Xg (rotor Ti70), a 4°C, por 1h. Após a ultracentrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento viral foi congelado a -80°C. Na sequência, as células e o sedimento viral congelados foram cuidadosamente ressuspensos utilizando 650 µL e 350 µL de tampão de lise gelado (0,01M Tris-HCl; 0,001 mM EDTA; 0,15 M NaCl; 1% de deoxicolato de sódio e 1% de Nonidet P-40, pH 7,5) suplementado com coquetel de inibidores de proteases (1:100, Sigma), respectivamente. Os sedimentos celulares e virais ressuspensos foram misturados e transferidos para um homogeneizador manual do tipo Dounce e foram submetidos a 20 movimentos de homogeneização. Após a lise, o material foi mantido em banho de gelo, por 1 h, e ultracentrifugado a 130000 Xg (rotor Ti70.i) a 4°C, durante 1 h.

Durante a ultracentrifugação, as colunas contendo os anticorpos B1E6 (anti-gE), B1C1 (anti-gC-1) ou 1E5F (anti-gC-2) e 1B11D8 (anti-gB1 e anti-gB-2) foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem (0,01M Tris-HCl; 0,001 mM EDTA; 0,5 M NaCl e 0,1% de Nonidet P-40, pH 7,5) para retirar a azida. Após, as colunas foram equilibradas com 10 mL de tampão de lavagem (0,01M Tris-HCl; 0,001 mM EDTA; 0,5 M NaCl e 0,1% de Nonidet P-40, pH 7,5) suplementado com coquetel de

inibidores de proteases (1:100, Sigma), com 10 mL de tampão de eluição (tampão glicina-HCl 0,1 M, pH 2,4) e, por último, com 20 mL de tampão de lavagem.

O sobrenadante da ultracentrifugação foi aplicado no topo da coluna B1E6 (anti-gE), o eluato coletado foi aplicado na coluna 1B11D8 (anti-gB1 e anti-gB-2) de 10 em 10 mL. Então, o eluato coletado na anti-gB foi aplicado na coluna B1C1 (anti-gC-1) ou 1E5F (anti-gC-2), também de 10 em 10 mL. Após passar na anti-gC, repetiu-se a passagem nas duas últimas colunas começando pela coluna anti-gB. A coluna B1E6 (anti-gE) foi utilizada para retirar a gE, que pode interferir na purificação da gB.

Após passar o material duas vezes pelas colunas anti-gB e anti-gC, as colunas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem e uma vez com tampão de lavagem sem Nonidet P-40. O material adsorvido nas colunas anti-gB e anti-gC foi então eluído com tampão de eluição: 2,5 mL de tampão de eluição foi colocado no topo da coluna e foi coletado 1 mL de eluato em cada tubo (2 tubos por vez). O eluato foi imediatamente neutralizado pela adição de 100 µL de tampão Tris-HCl 2M, pH 8,0 e o pH foi checado com papel indicador. O procedimento foi repetido dez vezes para cada coluna. Os eluatos foram mantidos a 4°C. Após terminar a eluição, as colunas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem e foram preenchidas com PBS contendo 0,5 % de azida.

Para determinar quais frações apresentavam a maior concentração de glicoproteínas foi realizado um ensaio do tipo ELISA: foram colocados 100 µL de tampão de carbonato de sódio nas placas de 96 cavidades (Immunosorb, Nunc, USA) e foi feita diluição seriada 1:10 de cada fração coletada. As placas foram mantidas 4°C, durante 12 h. Após este período, as placas foram lavadas três vezes com 300 µL de PBS-T (PBS + 0,03 % de Tween 20), foram bloqueadas, durante 15 min, com PBS-T contendo 2 % de BSA e foram incubados com 100 µL dos anticorpos monoclonais B1C1 para gC-1; 1E5F+ 3E2E3C2 para gC-2; e 1B11D8 para gB1 e gB-2 (SJOGREN-JANSSON; JEANSSON, 1985,1990) todos diluídos 1:100 em PBS-T contendo 1% de BSA, a temperatura ambiente, durante 2 h. Após incubação, as placas foram lavadas três vezes com 300 µL de PBS-T e foram incubadas com 100 µL do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (1:1000) (Jackson ImmunoResearch Laboratory, UK) em PBS-T contendo 1% de BSA, a temperatura ambiente, durante 2 h. As placas foram lavadas três vezes com 300 µL de PBS-T e incubadas com 200 µL de tampão dietanolamina

contendo *p*-nitrofenilfosfato. Os valores de absorbâncias foram medidos a 405-690 nm num espectrofotômetro (Organon Teknika – Microwell System).

As frações que apresentavam as maiores concentrações das glicoproteínas foram concentradas utilizando-se um tubo concentrador de 30 kD (Microsep, PallGelman Sciences, Sweden) o qual foi centrifugado a 5000 Xg, a 4° C, até obter-se aproximadamente 100 µL do concentrado. Após, foram adicionados 500 µL de solução de PBS e novamente foi centrifugado a 5000 Xg, a 4°C, até obter aproximadamente 100 µL do concentrado. O concentrado de proteínas obtido foi cuidadosamente ressuspensão e foi transferido para um tubo. O tubo concentrador foi lavado com mais 100 µL de solução de PBS. Esse volume também foi transferido para o tubo contendo o concentrado de proteínas. O material foi homogeneizado, aliquotado e mantido a -70°C. A concentração das proteínas nas preparações purificadas foi determinada pelo método de Lowry (DC Protein Assay Kit, Bio-Rad).

D - Efeito dos compostos sobre a ligação das glicoproteínas virais às células

O efeito dos compostos sobre a ligação das glicoproteínas gB ou gC do HSV às células GMK AH1 foi avaliado utilizando-se um ensaio tipo ELISA, segundo LYCKE et al. (1991).

Células GMK AH1, em uma densidade aproximada de 2×10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 96 cavidades com meio EMEM, suplementado com 5% de SFB e 1% de antibióticos/antifúngico até atingirem confluência. Os compostos foram diluídos em PBS (razão 1:5), trocando-se as ponteiras em cada diluição, transferiu-se 180 µL de cada diluição, duas replicatas, para uma placa de 96 cavidades vazia. No controle negativo, foi colocado somente PBS. As glicoproteínas purificadas gB e gC foram diluídas a uma concentração de 350 µg/mL e foram adicionados 150 µL destas diluições em cada diluição do composto, começando do controle negativo em direção a maior diluição. A placa foi levemente agitada e foi incubada a 4°C, por 15 min. As células foram lavadas uma vez com 200 µL de PBS, foram adicionados 100 µL da mistura glicoproteína+composto por cavidade e a placa foi incubada a 4°C, durante 1 h. Subseqüentemente, as células foram lavadas uma vez com 200 µL de PBS e fixadas com 100 µL de glutaraldeído 0,25% em PBS, durante 10 min, a temperatura ambiente. Após este período, as placas foram

lavadas três vezes com 300 μ L de PBS, foram bloqueadas com 200 μ L de PBS contendo 2% de BSA, por 30 min a temperatura ambiente. As células foram incubadas com 100 μ L dos anticorpos monoclonais B1C1 para gC-1; 1E5F+3E2E3C2 para gC-2; e 1B11D8 para gB1 e gB-2, todos diluídos 1:100 em PBS contendo 1% de BSA, a temperatura ambiente, durante 1 h. Após incubação, as placas foram lavadas três vezes com 300 μ L de PBS e foram incubadas com 100 μ L do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (1:1000) (Jackson ImmunoResearch Laboratory, UK) em PBS contendo 1% de BSA, a temperatura ambiente, durante 1 h. As placas foram lavadas três vezes com 300 μ L de PBS e incubadas com 200 μ L de tampão dietanolamina contendo *p*-nitrofenilfosfato. Os valores de absorbâncias foram medidos a 405-690 nm em espectrofotômetro (Organon Teknika, Microwell System).

4.2.11.6 Preparação e avaliação da sensibilidade das variantes do HSV resistentes ao composto

As maiores placas de lise virais, desenvolvidas em presença do inibidor, foram purificadas até homogeneidade, através de três repetições do procedimento de purificação de placa (EKBLAD et al., 2007).

A- Purificação dos vírus resistentes

Células GMK AH1, em uma densidade aproximada de 2×10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 6 cavidades com meio EMEM, suplementado com 5% de SFB e 1% de antibióticos/antifúngico até atingirem confluência. O meio foi aspirado e a monocamada de células foi lavada uma vez com EMEM+ 1% de antibióticos/antifúngico. O meio foi retirado e foram adicionados, em duplicata, 1000 μ L da suspensão viral contendo aproximadamente 100 PFU dos vírus HSV-2 cepa 333, HSV-2 gC-negativa gCneg1, HSV-1 cepa KOS 321, HSV-1 cepa gC⁻39 ou HSV-1 cepa MP. As placas foram, então, incubadas a 37°C, durante 2 h, em estufa de CO₂. Após esse tempo, a suspensão viral foi aspirada, a monocamada de células foi lavada uma vez com EMEM+ 1% de antibióticos/antifúngico e foi adicionado o composto em uma concentração de 100 μ g/mL em meio EMEM + metilcelulose 1% em solução de Hanks (1:1) acrescido de 1% de antibiótico/antifúngico. Após um período de incubação de 72 h, foram coletadas as maiores placas de lise virais desenvolvidas na presença do inibidor. Cada placa viral coletada (2 μ L) foi

transferida para uma nova placa de 12 cavidades contendo uma monocamada confluyente e 1 mL de meio EMEM e foi incubada a 37°C, durante 2 h. Posteriormente, foi retirado o meio, a monocamada foi lavada uma vez com meio EMEM, foi adicionado o composto na concentração de 100 µg/mL em meio EMEM + metilcelulose 1% em solução de Hanks (1:1) acrescido de 1% de antibiótico/antifúngico e a placa foi incubada a 37°C, durante 72 h.

O procedimento de coleta de placas virais foi repetido mais duas vezes com o intuito de purificar as placas virais.

B- Preparação do pré-estoque

Após a terceira purificação, foi verificado que as placas virais de cada cepa viral apresentavam uma aparência homogênea. Na sequência, foi coletada uma placa purificada e esta foi transferida para uma nova placa, conforme procedimento descrito abaixo: células GMK AH1, em uma densidade aproximada de 2×10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 6 cavidades com meio EMEM, suplementado com 5% de SFB e 1% de antibióticos/antifúngico até atingirem confluência. O meio foi aspirado, a monocamada de células foi lavada uma vez com EMEM e foram adicionados 1 mL de EMEM, suplementado com 1% de antibióticos/antifúngico. Foi coletada uma única placa purificada de cada vírus obtido e esta foi transferida para uma cavidade da placa de 6 cavidades. A placa foi incubada a 37°C, durante 2 h. Após este tempo, a suspensão viral foi aspirada, foram adicionados 2 mL de meio EMEM, suplementado com 1% de antibióticos/antifúngico e a placa foi incubada novamente a 37°C, até completo ECP.

C- Preparação do estoque

Após completo ECP, os vírus e as células do pré-estoque foram coletados, centrifugados a 1000 Xg, por 10 min. Células GMK AH1, em uma densidade aproximada de 2×10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 6 cavidades com meio EMEM, suplementado com 5% de SFB e 1% de antibióticos/antifúngico até atingirem confluência. O meio foi aspirado, a monocamada de células foi lavada uma vez com EMEM e foi adicionado 1 mL de EMEM, suplementado com 1% de antibióticos/antifúngico. As seis cavidades da placa foram infectadas com 10 µL/cavidade do pré-estoque de cada vírus. A placa foi incubada a 37°C, durante 2 h. Após este tempo, a suspensão viral foi aspirada, foi adicionado 2 mL de meio

EMEM, suplementado com 1% de antibióticos/antifúngico e a placa foi incubada a 37°C, até completo ECP. Após completo ECP os vírus e as células do estoque foram coletadas, centrifugadas a 1000 *xg*, por 10 min. A suspensão viral foi alíquotada em tubos estéreis e armazenados a –70°C até sua utilização. O restante do material do pré-estoque também foi mantido a – 70°C.

D - Avaliação da sensibilidade

As cepas parentais do HSV-1 e as variantes do HSV-1 resistentes aos compostos foram avaliadas pelo método de redução de formação de placa de lise e pelo método de redução do tamanho das placas de lise, conforme técnica descrita no item 4.2.9 item B e 4.2.11.4 item A, respectivamente.

4.2.12 Análise Estatística

Realizou-se uma análise de regressão linear para calcular os valores de CC₅₀ e de CE₅₀, a partir de curvas de concentração *versus* efeito.

Os valores obtidos nos processos de triagem representam a média de dois experimentos independentes.

Os demais resultados obtidos no Laboratório de Virologia Aplicada/UFSC representam à média ± desvio padrão de três experimentos independentes com uma réplica cada. Enquanto que, os resultados obtidos no Departamento de Virologia Clínica da Universidade de Göteborg/Suécia representam a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes com duas réplicas cada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE

5.1.1 Caracterização dos compostos

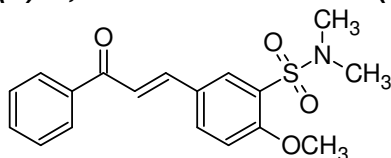
Na síntese orgânica além de racionalizar uma sequência de etapas sintéticas visando obter os melhores rendimentos possíveis, também é necessário dispensar atenção ao grau de pureza, a identificação e a confirmação da estrutura dos compostos sintetizados.

Os compostos sintéticos, normalmente, são produtos de um processo sintético de múltiplas etapas, assim a pureza do produto final está diretamente relacionada à metodologia sintética empregada e à pureza dos intermediários e matérias-primas envolvidas na síntese.

Entre os métodos físicos de análise empregados na determinação estrutural dos compostos sintetizados, a espectrometria de massa, a espectroscopia no ultravioleta, no visível e no infravermelho, bem como a ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C constituem os mais amplamente empregados.

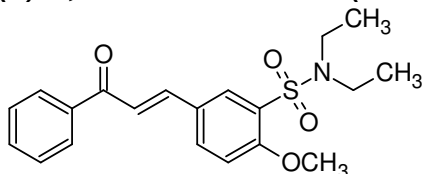
Os compostos sintetizados foram caracterizados através das análises dos espectros de absorção no infravermelho, dos espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C e das análises elementares:

(E)-N,N-dimetil-2-metoxi-5-(3-oxo-3-fenilprop-1-enil)benzenosulfonamida (22)



Sólido amarelo pálido, rendimento 43%. p.f.: 140 -144°C (p.f.: 140 - 141°C - CREMLYN et al., 1984).

(E)-N,N-diethyl-2-metoxi-5-(3-oxo-3-fenilprop-1-enil)benzenosulfonamida (23)



Sólido amarelo pálido, rendimento 40%. p.f: 149-150°C.

IV (KBr) : $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$ 1659, 1595, 1323, 1217, 1144, 700.

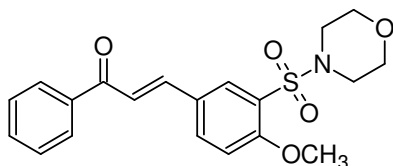
^1H RMN (CDCl_3): δ 1,13 (t, $J=7,0$ Hz, 6H), 3,35 (q, $J=7,0$ Hz, 4H), 3,98 (s, 3H), 7,04 (d, $J=8,6$ Hz, 1H), 7,48-7,70 (m, 5H), 7,76 (d, $J=15,68$ Hz, 1H), 8,05 (d, $J=7,0$ Hz, 2H), 8,30 (s, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ 14,24; 41,78; 56,13; 112,41; 121,46; 127,35; 128,46; 128,60; 129,88; 130,48; 132,83; 134,75; 137,97; 142,75; 157,99; 190,10.

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_4\text{S}$: C, 64,32; H, 6,21; N, 3,75; S, 8,59.

Encontrado C, 64,00; H, 6,11; N, 3,73; S 8,03%.

(E)-3-[4-metoxi-3-(morfolinosulfonil)fenil]-1-fenilprop-2-en-1-one (24)



Sólido amarelo, rendimento 38%. p.f. : 158-159°C.

IV (KBr): ν_{max} cm^{-1} 1661, 1596, 1152, 1109, 699.

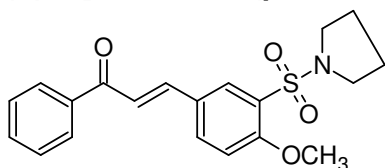
^1H RMN (CDCl_3): δ 3,27 (t, $J=4$ Hz, 4H), 3,74 (t, $J=4$ Hz, 4H), 3,99 (s, 3H), 7,08 (d, $J=8,6$ Hz, 1H), 7,64-7,45 (m, 3H), 7,74 (d, $J=8,0$ Hz, 1H), 7,77 (d, $J=15,7$ Hz, 1H), 8,03 (d, $J=7,7$ Hz, 2H), 8,23 (s, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ 46,01; 56,32; 66,71; 112,79; 121,81; 126,92; 127,72; 128,50; 128,66; 131,12; 132,94; 135,18; 137,95; 142,46; 158,25; 190,06.

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_5\text{S}$: C, 62,00; H, 5,46; N, 3,62; S, 8,28.

Encontrado: C, 61,70; H, 5,37; N, 3,73; S 8,05%.

(E)-3-[4-metoxi-3-(pirrolidin-1-ilsulfonil)fenil]-1-fenilprop-2-en-1-one (25)



Sólido amarelo, rendimento 52%. p.f.: 162-166°C.

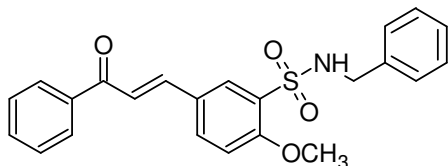
IV (KBr): ν_{max} cm^{-1} 1661, 1594, 1328, 1217, 1148, 701.

^1H RMN (CDCl_3): δ 1,83 (q, $J=6,4$ Hz, 4H), 3,38 (t, $J=6,4$ Hz, 4H), 3,99 (s, 3H), 7,08 (d, $J=8$ Hz, 1H), 7,47-7,77 (m, 4H), 7,81 (d, $J=14,28$ Hz, 1H), 8,01 (d, $J=7,0$ Hz, 2H), 8,3 (s, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ 26,09; 48,05; 57,20; 112,76; 121,85; 128,11; 128,37; 128,90; 131,40; 133,13; 135,20; 137,97; 142,94; 157,36; 191,05.

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{S}$: C, 64,67; H, 5,70; N, 3,77; S, 8,63.

Encontrado C, 64,22; H, 5,62; N, 3,83; S 8,49%.

N-Benzil-2-metoxi-5-(3-oxo-3-fenil-1-propenil)-benzenosulfonamida (26)

Sólido cristalino amarelo pálido, rendimento, 42% p.f.: 167-169°C.

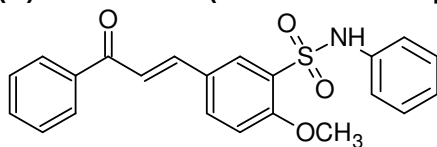
IV (KBr): ν_{max} cm^{-1} 3210, 1655, 1591, 1162, 693.

^1H RMN (CDCl_3): δ 4,09 (s, 3H), 4,14 (d, $J=6$ Hz, 2H), 5,2 (t, $J=6$ Hz, 1H), 6,94 (d, $J=8$ Hz, 1H), 7,03 (m, 4H), 7,14 (d, $J=15,8$ Hz, 1H), 7,56-7,42 (m, 4H), 7,63 (d, $J=8$ Hz, 1H), 7,73 (d, $J=15,8$ Hz, 1H), 8,04 (d, $J=7,0$ Hz, 2H), 8,25 (s, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ 48,43; 57,17; 113,10; 122,51; 128,57; 129,09; 129,21; 129,37; 129,99; 133,65; 135,96; 136,75; 138,63; 143,12; 157,99; 190,73.

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{S}$: C, 67,79; H, 5,19; N, 3,44; S, 7,87.

Encontrado: C, 67,52; H, 5,11; N, 3,50; S 7,62%.

(E)-2-metoxi-5-(3-oxo-3-fenil-1-propenil)-N-fenil-benzenosulfonamida (27)

Sólido amarelo, rendimento 47%. p.f.: 200-202°C.

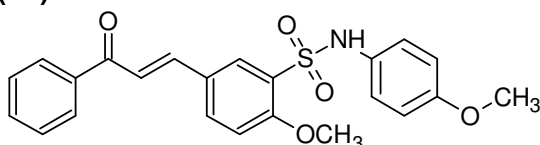
IV (KBr): ν_{max} cm^{-1} 3329, 1661, 1597, 1158, 693.

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$): δ 4,10 (s, 3H), 7,02-7,25 (m, 5H), 7,44 (d, $J=15,70$ Hz, 1H), 7,50-7,80 (m, 6H), 7,91 (d, $J=6,90$ Hz, 2H), 8,2 (s, 1H), 10,0 (s, 1H).

^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$): δ 56,05; 115,42; 120,17; 124,07; 126,93; 127,24; 128,04; 128,25; 128,65; 130,00; 132,5; 134,64; 137,53; 142,24; 157,49; 189,61.

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{NO}_4\text{S}$: C, 67,16; H, 4,87; N, 3,56; S, 8,15.

Encontrado: C, 66,82; H, 4,77; N, 3,50; S 7,80%.

(E)-N-(4-metoxifenil)-2-metoxi-5-(3-oxo-3-fenil-1-propenil)-benzenosulfonamida (28)

Sólido branco, rendimento 60%. p.f.: 183-185°C.

IV (KBr): ν_{max} cm^{-1} 3242, 1659, 1595, 1154, 643.

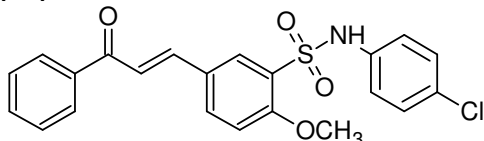
^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$): δ 3,67 (s, 3H), 4,09 (s, 3H), 7,02 -7,26 (m, 5H), 7,50-7,60 (m, 3H), 7,69 (d, $J=16$ Hz), 7,73 (d, $J=15,7$ Hz, 1H), 8,09-8,1 (m, 4H), 9,85 (s, 1H).

^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$): δ 55,76; 57,25; 114,87; 115,42; 122,05; 127,55; 127,76;

129,22; 129,44; 130,77; 131,44; 133,78; 135,83; 138,23; 143,10; 157,00; 158,52; 189,68.

Análise elementar: calculado para $C_{23}H_{21}NO_5S$: C, 65,23; H, 5,00; N, 3,31; S, 7,57. Encontrado: C, 65,58; H, 4,92; N, 3,41; S 7,40%.

(E)-N-(4-clorofenil)-2-metoxi-5-(3-oxo-3-fenil-1-propenil)-benzenosulfonamida (29)



Sólido branco, rendimento 51%. p.f.: 205-207°C.

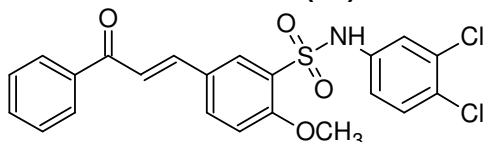
IV (KBr): $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$ 3249, 1660, 1598, 1496, 1147, 689.

^1H RMN (DMSO- d_6): δ 4,06 (s, 3H), 7,02-7,10 (m, 3H), 7,16 (d, $J=8,0$ Hz, 2H), 7,42 (d, $J=14$ Hz, 1H), 7,49-7,56 (m, 2H), 7,56-7,78 (m, 3H), 7,99 (d, $J=8$ Hz, 2H), 8,12 (s, 1H), 9,87 (s, 1H).

^{13}C RMN (DMSO- d_6): δ 57,04; 112,88; 122,36; 122,96; 127,70; 128,53; 128,76; 128,92; 128,67; 130,41; 131,57; 133,22; 135,83; 135,88; 138,00; 142,42; 157,90; 190,05.

Análise elementar: calculado para $C_{22}H_{18}ClNO_4S$: C, 61,75; H, 4,24; Cl, 8,29; N, 3,27; S, 7,49. Found C, 62,03; H, 4,22; N, 3,43; S 7,4%.

(E)-N-(3,4-diclorofenil)-2-metoxi-5-(3-oxo-3-fenil-1-propenil)-benzenosulfonamida (30)



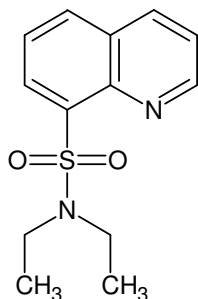
Sólido amarelo, rendimento 48% p.f.: 218-219°C.

IV (KBr) $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$ 3238, 1652, 1590, 1495, 1160, 654.

^1H RMN (CDCl_3): δ 4,09 (s, 3H), 7,01 (dd, $J=2,2$ e 8,6 Hz, 1H), 7,09 (d, $J=14,8$ Hz, 1H), 7,24-7,39 (m, 2H), 7,55-7,67 (m, 5H), 7,78 (d, $J=14,8$ Hz, 1H), 8,01 (d, $J=7,2$ Hz, 2H), 8,15 (s, 1H), 9,82 (s, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ 56,83; 112,76; 120,26; 122,23; 122,78; 126,69; 128,16; 128,53; 128,68; 129,14; 130,14; 130,92; 133,00; 135,79; 136,03; 137,86; 142,09; 157,35; 190,04.

Análise elementar: calculado para $C_{22}H_{17}Cl_2NO_4S$: C, 57,15; H, 3,71; Cl, 15,34; N, 3,03; S, 6,94. Encontrado: C, 56,93; H, 3,71; N, 3,09; S 6,50%.

***N,N*-dietil-8-quinolinassulfonamida (38)**

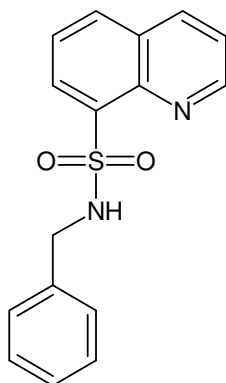
Sólido cristalino, 76 % de rendimento, p.f. 105-106°C.

IV (KBr): ν_{max} cm^{-1} 1490, 1314, 1132.

^1H RMN (CDCl_3): δ = 1,03(t, $J=6,8$, 6H), 3,44 (q, $J=6,8$, 4H), 7,48 (dd $J=4,40$ e 8 Hz, 1H), 7,57 (dd $J=7,4$ e 8,4 Hz, 1H), 7,98 (dd, $J=1,2$ e 8,4 Hz, 1H), 8,19 (dd $J=2,0$ e 8 Hz, 1H), 8,47 (dd $J=1,2$ e 7,4 Hz, 1H) 9,03, (dd $J=2,0$ e 4,40 Hz, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ = 14,79; 42,76; 122,07; 125,66; 129,18; 132,83; 133,19; 136,57; 139,019; 144,35; 151,16.

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: C, 59,07; H, 6,10; N, 10,60; S, 12,13. Encontrado: C, 59,18 ; H, 6,02; N, 10,78; S, 11,81%.

***N*-benzil-8-quinolinassulfonamida (39)**

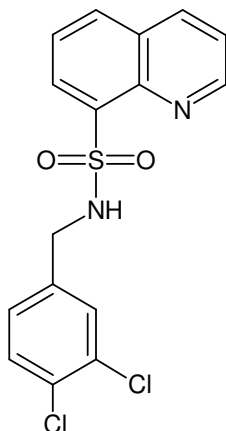
Sólido cristalino, 70 % de rendimento, p.f. 127-129°C (119-120 °C; BUCHMANN, G.; SCHALINATUS, 1962).

IV (KBr): ν_{max} cm^{-1} 3207, 1490, 1325, 1213, 1164.

^1H RMN (CDCl_3): δ = 4,06 (d, $J=6,4$ Hz, 2H), 6,63 (t, $J=6,4$ Hz, 1H), 7,03 (m, 5H), 7,50 (dd, $J=4,4$ e 8,4 Hz, 1H), 7,61 (dd $J=7,4$ e 8,0 Hz, 1H), 8,00 (dd $J=1,6$ e 8 Hz, 1H), 8,22 (dd $J=1,2$ e 8 Hz, 1H), 8,41 (dd, $J=1,6$ e 7,4 Hz, 1H), 8,92 (dd, $J=1,2$ e 4,4 Hz, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ = 48,06; 122,43; 125,93; 127,78; 128,08; 128,44; 128,91; 128,91; 131,40; 133,51; 136,23; 137,21; 143,36; 151,34.

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: C, 64,41; H, 4,73; N, 9,39; S, 10,75. Encontrado: C, 64,05; H, 5,02; N, 9,68; S, 11,89%

***N*-(3,4-diclorobenzil)-8-quinolinassulfonamida (40)**

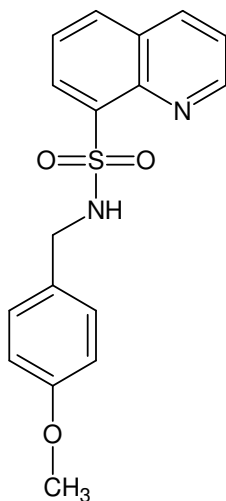
Sólido branco, 86 % de rendimento, p.f. 132-134°C.

IV (KBr): ν_{max} cm^{-1} 3246, 1452, 1328, 1212, 1142.

^1H RMN (CDCl_3): δ = 4,04 (d, $J=6,8$ Hz, 2H), 6,86 (t, $J=6,8$ Hz, 1H), 7,05 (d, $J=8$ Hz, 1H), 7,53 (m, 2H), 8,01 (m, 2H), 8,23 (dd $J=1,8$ e 8 Hz, 1H), 8,35 (m, 2H), 8,95 (dd, $J=1,6$ e 8 Hz, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ = 46,95; 109,99; 122,58; 125,95; 127,48; 128,93; 130,05; 130,08; 131,26; 131,71; 133,59; 136,60; 137,28; 143,11; 151,40.

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: C, 52,33; H, 3,29; N, 7,63; S, 8,73. Encontrado: C, 52,31; H, 3,32; N, 7,69; S, 8,90%.

***N*-(4-metoxibenzil)-8-quinolinassulfonamida (41)**

Sólido amarelo pálido cristalino, 70 % de rendimento, p.f. 74-75°C.

IV (KBr): ν_{max} cm^{-1} 3273, 1511, 1310, 1246, 1136.

^1H RMN (CDCl_3): δ = 3,67 (s, 3H), 4,00 (d, $J=8$ Hz, 2H), 6,54 (m, 3H), 6,91 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7,50 (dd, $J=4,4$ e 8,6 Hz, 1H), 7,61 (dd $J=7,6$ e 8,4 Hz, 1H), 8,00 (dd $J=1,2$ e 8,40 Hz, 1H), 8,22 (dd $J=1,6$ e 8,6 Hz, 1H), 8,39 (dd, $J=1,2$ e 7,6 Hz, 1H), 8,92 (dd

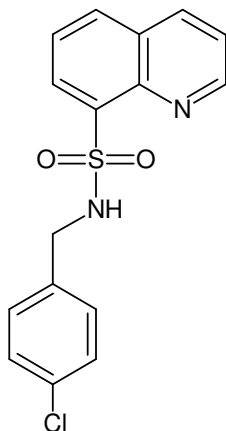
$J=1,6$ e $4,4$ Hz, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ = 47,62; 55,44; 113,70; 122,40; 125,92; 128,40; 128,90; 129,43; 131,41; 133,42; 136,33; 137,16; 143,35; 151,28; 159,11.

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: C, 62,18; H, 4,91; N, 8,53; S, 9,76.

Encontrado: C, 61,89; H, 4,80; N, 8,67; S, 9,48%.

N-(4-clorobenzil) -8-quinolinassulfonamida (42)



Sólido cristalino, 75 % de rendimento, p.f. 105-107°C.

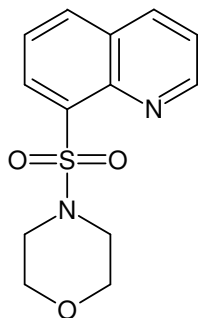
IV (KBr): ν_{max} cm^{-1} 3206, 1488, 1326, 1210, 1165.

^1H RMN (CDCl_3): δ = 4,0 (s, 2H), 6,58 (s, 1H), 6,84 (m, 4H), 7,52 (dd, $J=4,4$ e 8,4 Hz, 1H), 7,60 (dd $J=7,2$ e 8,0 Hz, 1H), 8,02 (dd $J=1,2$ e 8 Hz, 1H), 8,24 (dd $J=1,2$ e 8,4 Hz, 1H), 8,36 (dd, $J=1,2$ e 7,2 Hz, 1H), 8,92 (dd $J=1,2$ e 4,4 Hz, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ = 47,36; 122,48; 125,94; 128,92; 129,41; 131,33; 133,54; 134,92; 136,27; 137,25; 143,24; 151,34.

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$: C, 57,74; H, 3,94; N, 8,42; S, 9,63. Encontrado: C, 52,43; H, 3,27; N, 7,66; S, 8,99%.

4-(8-quinolilssulfonil)-morfolina (43)



Sólido branco cristalino, 69 % de rendimento, p.f. 178-179°C (179-180°C; VINOKUROVA; FELDMAN, 1968).

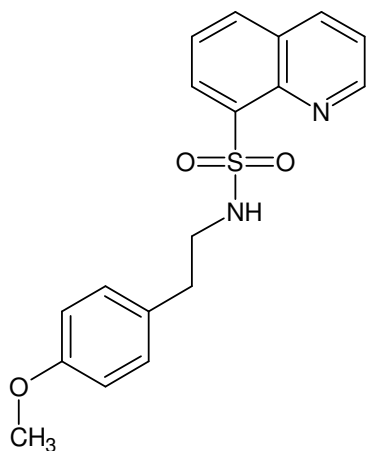
IV (KBr): ν_{max} cm^{-1} 1492, 1336, 1113, 1167.

^1H RMN (CDCl_3): δ = 3,34 (t, $J=4$, 4H) 3,61 (t, $J=4$, 4H), 7,49 (dd $J=4$ e 8 Hz, 1H), 7,58 (dd $J=7,3$ e 8,4 Hz, 1H), 8,01 (dd, $J=1,2$ e 8,4 Hz, 1H), 8,21 (dd $J=1,6$ e 8 Hz, 1H), 8,44 (dd $J=1,2$ e 7,3 Hz, 1H) 9,04, (dd $J=1,6$ e 4 Hz, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ = 46,66; 67,13; 109,99; 122,34; 125,75; 129,24; 133,57; 133,88; 136,68; 136,71; 144,42; 151,46

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: C, 56,10; H, 5,07; N, 10,06; S, 11,52 Encontrado: C, 56,40; H, 5,01; N, 10,35; S, 11,30%.

***N*-[2-(4-metoxifenil)etil]-8-quinolinassulfonamida (44)**



Sólido cristalino, 51 % de rendimento, p.f. 124-126°C.

IV (KBr): ν_{max} cm^{-1} 3219, 1512, 1322, 1252, 1165.

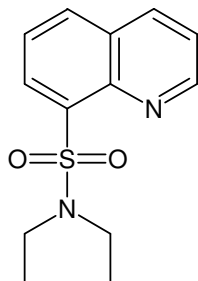
^1H RMN (CDCl_3): δ = 2,65 (t, $J=6,6$ 2H), 3,09 (q, $J=6,6$ Hz, 2H), 3,75 (s, 3H), 6,25 (t, $J=6,6$ Hz, 2H), 7,42 (dd, $J=4,4$ e 8,0 Hz, 1H), 7,60 (dd $J=7,2$ e 8,0 Hz, 1H), 8,09 (dd $J=1,2$ e 8,4 Hz, 1H), 8,22 (dd $J=1,6$ e 8,0 Hz, 1H), 8,35 (dd, $J=1,2$ e 7,2 Hz, 1H), 8,63 (dd $J=1,6$ e 4,4 Hz, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ = 34,65; 45,12; 55,49; 114,08; 122,22; 125,84; 128,82; 129,80; 130,06; 131,32; 133,47; 137,05; 143,20; 151,17; 158,43.

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: C, 63,14; H, 5,30; N, 8,18; S, 9,36.

Encontrado: C, 62,10; H, 5,64; N, 8,25; S, 10,95%.

1-(8-quinolilssulfonil)-pirrolidina (45)



Sólido branco cristalino, 68 % de rendimento, p.f. 127-129°C.

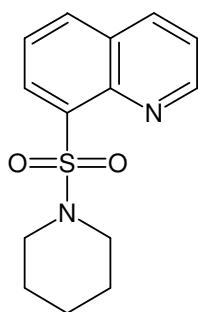
IV (KBr): $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$ 1488, 1324, 1135.

^1H RMN (CDCl_3): δ = 1,67 (m, 4H) 3,57 (m, 4H), 7,48 (dd $J=4,00$ e 8 Hz, 1H), 7,57 (dd $J=7,2$ e 8,0 Hz, 1H), 7,98 (dd, $J=1,2$ e 8,0 Hz, 1H), 8,21 (dd $J=1,60$ e 8 Hz, 1H), 8,48 (dd $J=1,2$ e 7,2 Hz, 1H) 9,03, (dd $J=1,60$ e 4,00 Hz, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ = 26,12; 48,36; 122,15; 125,72; 129,24; 133,42; 133,89; 136,74; 137,42; 144,48; 151,27.

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: C, 59,52; H, 5,38; N, 10,68; S, 12,22. Encontrado: C, 59,62 ; H, 5,22; N, 10,93; S, 11,99%.

1-(8-quinolilssulfonil)-piperidina (46)

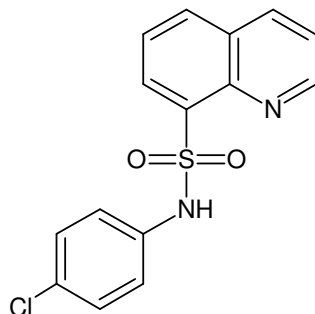


Sólido cristalino, 79 % de rendimento, p.f. 154-155°C (157-158°C; VINOKUROVA; FELDMAN, 1968).

^1H RMN (CDCl_3): δ = 1,52 (m, 6H) 3,29 (t, $J=4$, 4H), 7,47 (dd $J=4$ e 8 Hz, 1H), 7,56 (dd $J=7,6$ e 8,0 Hz, 1H), 7,98 (dd, $J=1,2$ e 8,0 Hz, 1H), 8,19 (dd $J=1,6$ e 8 Hz, 1H), 8,43 (dd $J=1,2$ e 7,6 Hz, 1H) 9,03, (dd $J=1,6$ e 4 Hz, 1H).V

^{13}C RMN (CDCl_3): δ = 24,17; 26,17; 47,43; 112,14; 125,69; 129,18; 133,22; 136,56; 137,40; 144,52; 151,31.

N-(4-clorofenil)-8-quinolinassulfonamida (47)



Sólido branco cristalino, 72 % de rendimento, p.f. 198-200°C (197-198°C; VINOKUROVA; FELDMAN, 1968).

IV (KBr): $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$ 3184, 1496, 1334, 1139.

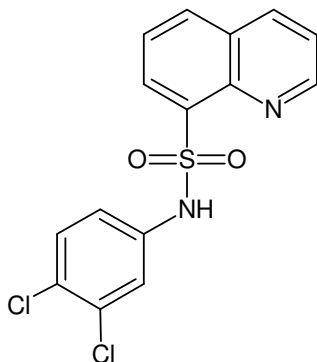
^1H RMN (CDCl_3): δ = 6,90 (dd $J=2$ e 6,8 Hz, 2H), 7,10 (dd $J=2$ e 6,8 Hz, 2H), 7,54 (m, 2H), 8,10 (dd, $J=1,2$ e 8 Hz, 1H), 8,26 (m, 2H), 8,40 (s, 1H), 9,10 (dd $J=1,6$ e 4,4

Hz, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ = 122,70; 123,66; 126,03; 129,02; 129,36; 131,19; 132,10; 134,07; 135,20; 135,82; 137,57; 143,23; 151,58.

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$: C, 56,52; H, 3,48; N, 8,79; S, 10,06 Encontrado: C, 56,56; H, 3,45; N, 8,78; S, 10,26%.

N-(3,4-diclorofenil)-8-quinolinassulfonamida (48)



Sólido branco cristalino, 70 % de rendimento, p.f. 224-226°C.

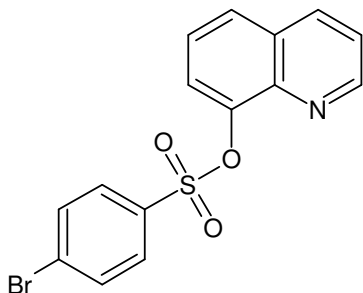
IV (KBr): $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$ 3110, 1477, 1324, 1165.

^1H RMN (CDCl_3): δ = 6,83 (dd $J=4$ e 8 Hz, 1H), 7,12 (dd $J=4$ e 8 Hz, 2H), 7,57 (m, 2H), 8,02 (dd, $J=1,2$ e 8 Hz, 1H), 8,29 (m, 2H), 8,48 (s, 1H), 9,12, (dd $J=1,6$ e 4,4 Hz, 1H),

^{13}C RMN (CDCl_3): δ = 118,1; 120,2; 121,5; 123,4; 124,3; 127,3; 128,9; 129,1; 131,5; 131,8; 136,4; 137,2; 140; 141,9; 149,9.

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$: C, 51,00; H, 3,45; N, 8,78; S, 10,26 Encontrado: C, 50,56; H, 2,59; N, 7,91; S, 9,88%.

4-bromobenzenosulfonato de 8-quinolinila (49)



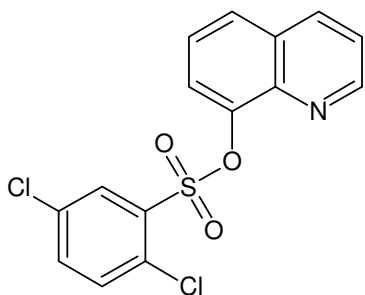
Sólido branco, 55 % de rendimento, p.f. 116-118°C.

^1H RMN (CDCl_3): δ = 7,39 (dd $J=4,00$ e 8,0 Hz, 1H), 7,51 7,65 (dd, $J= 4,0$ e 8,0 Hz, 1H), 7,58 (d, $J= 8,0$ Hz, 2H), 7,65 (dd, $J= 4,0$ e 8,0 Hz, 1H), 7,76 (dd, $J= 4,0$ e 8,0 Hz, 1H), 7,84 (d, $J= 8$ Hz, 2H), 8,13 (dd, $J=4,0$ e 8,0 Hz, 1H), 8,76 (dd, $J=4,0$ e 4,4 Hz, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ = 109,99; 122,20; 123,02; 126,31; 127,51; 129,47; 129,87; 130,53; 132,29; 135,37; 136,03; 141,52; 145,50; 151,04.

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{BrNO}_3\text{S}$: C, 49,47; H, 2,77; N, 3,85; S, 8,80
Encontrado: C, 49,72; H, 2,76; N, 3,84; S, 9,18%.

2,5-diclorobenzenosulfonato de 8-quinolinila (50)



Sólido branco cristalino, 77 % de rendimento, p.f. 151-153°C.

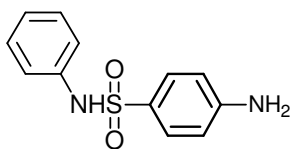
IV (KBr): ν_{max} cm^{-1} 1454, 1381, 1184, 1037.

^1H RMN (CDCl_3): δ = 7,37 (dd $J=4,40$ e 8,0 Hz, 1H), 7,48 (m, 3H), 7,57 (dd, $J=1,2$ e 8,0 Hz, 1H), 7,75 (dd, $J=1,2$ e 8,0 Hz, 1H), 8,02 (d, $J=2,4$ Hz, 1H), 8,12 (dd, $J=1,2$ e 8,0 Hz, 1H), 8,69 (dd, $J=1,6$ e 4,4 Hz, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ = 122,01; 122,72; 126,00; 127,39; 129,61; 131,50; 132,12; 132,70; 132,91; 134,39; 135,72; 136,41; 141,21; 145,66; 150,70.

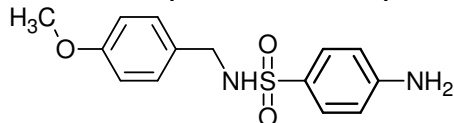
Análise elementar: calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{NO}_3\text{S}$: C, 50,86; H, 2,56; N, 3,95; S, 9,05
Encontrado: C, 50,71; H, 2,49; N, 3,99; S, 9,15%.

4-amino-*N*-phenyl-benzenosulfonamida (207)



Sólido branco, 80 % de rendimento, p.f. 198-199°C. (lit. p.f.: 200°C; MELEGARI, 1976)

4-amino-*N*-(4-metoxibenzil)benzenosulfonamida (208)



Sólido cristalino branco, 90 % de rendimento, p.f. 134-136°C.

IV (KBr): ν_{max} cm^{-1} 3409, 3336, 1508, 1302, 1140.

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 3,68 (s, 3H), 3,75 (d, $J=4$ Hz, 2H), 5,88 (s, 2H), 6,57 (d, $J=8,0$ Hz, 2H), 6,80 (d, $J=8,0$ Hz, 2H), 7,09 (d, $J=8,0$ Hz, 2H), 7,39 (d, $J=8,0$ Hz, 2H),

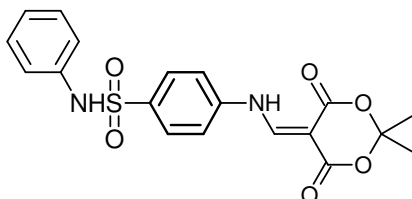
7,49 (t, $J=4$ Hz, 1H).

^{13}C RMN (DMSO- d_6): δ = 46,30; 55,74; 113,33; 114,26; 126,28; 129,14; 129,57; 130,53; 153,11; 159,03.

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: C, 57,52; H, 5,52; N, 9,58; S, 10,97.

Encontrado: C, 57,22; H, 5,29; N, 8,36; S, 9,02%.

4-[(2,2-dimetil-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-ilideno)metilamino]-*N*-(fenilbenzenosulfonamida (209)



Sólido branco, 73 % de rendimento, p.f. 214-218°C.

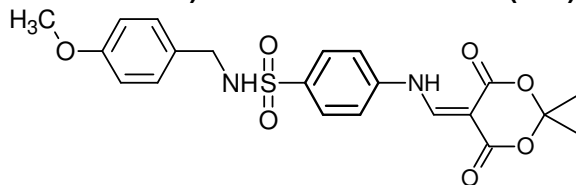
^1H RMN (DMSO- d_6): δ = 1,66 (s, 6H), 6,63 (s, 1H), 7,09 (d, $J=7,6$ Hz, 2H), 7,30 (m, 5H), 7,83 (d, $J=7,6$ Hz, 2H), 8,55 (d, $J=14$ Hz, 1H), 11,20 (d, $J=14$ Hz, 1H).

^{13}C RMN (DMSO- d_6): δ = 27,38; 105,91; 118,06; 122,33; 126,21; 129,74; 129,79; 136,16; 136,80; 141,65; 152,10; 163,29; 165,55

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$: C, 56,71; H, 4,51; N, 6,96; S, 7,97

Encontrado: C, 56,33 ; H,4,17; N, 6,95; S, 7,50%.

4-[(2,2-dimetil-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-ilideno)metilamino]-*N*-(metoxibenzil)benzenosulfonamida (210)



Sólido branco, 61 % de rendimento, p.f. 239-242°C.

IV (KBr): ν_{max} cm^{-1} 3450, 3277, 2930, 1729, 1687, 1635, 1310, 1150.

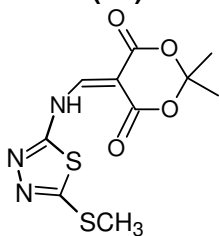
^1H RMN (DMSO- d_6): δ = 1,60 (s, 6H), 3,62 (s, 3H), 3,86 (d, $J=8$ Hz, 2H), 6,76 (d, $J=7,2$ Hz, 2H), 7,06 (d, $J=7,2$ Hz, 2H), 7,68 (m, 4H), 8,04 (t, $J=8$ Hz, 1H), 8,59 (d, $J=13$ Hz, 1H), 11,24 (d, $J=13$ Hz, 1H).

^{13}C RMN (DMSO- d_6): δ = 27,21; 46,37; 55,73; 105,06; 114,31; 120,02; 128,76; 129,67; 129,97; 138,42; 142,33; 153,87; 159,14; 163,29; 164,36.

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$: C, 56,49; H, 4,97; N, 6,27; S, 7,18

Encontrado: C, 56,68; H, 4,90; N, 6,36; S, 7,27%.

2,2-dimetil-5-[(5-metiltio)-1,3,4-tiadiazol-2-ilamino]metileno]-1,3-dioxano-4,6-dione (51)



Sólido branco cristalino, 81 % de rendimento, p.f. 183-185°C.

IV (KBr): ν_{max} cm^{-1} 3234, 2991, 1737, 1686, 1610.

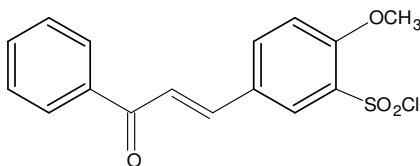
^1H RMN (CDCl_3): δ = 1,73 (s, 6H), 2,73 (s, 3H), 8,70 (d, $J=12$ Hz, 1H), 11,49 (d, $J=12$ Hz, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3): δ = 16,56; 27,54; 91,84; 106,17; 152,70; 160,82; 162,20; 163,75; 165,17.

Análise elementar: calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$: C, 39,86; H, 3,68; N, 13,94; S, 21,28 Encontrado: C, 40,00; H, 3,61; N, 13,89; S, 21,01%.

5.1.2 Sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona

O cloreto da 4-metoxichalcona-3-sulfonila (**21**) foi obtido através da reação da 4-metoxichalcona com 6 equivalentes de ácido clorossulfônico, durante uma semana a temperatura ambiente. A 4-metoxichalcona foi facilmente convertida ao 3-cloreto de sulfonila, com rendimento de 95%, devido à ativação do anel pelo grupo metoxila. Em contraste com o prolongado tempo de reação (três semanas), a temperatura ambiente, descrito para a obtenção do 4-cloreto de sulfonila da chalcona não substituída (CREMLYN et al., 1984). Como a reação com ácido clorossulfônico é reversível, foi utilizado um excesso de ácido clorossulfônico (6 equivalentes) assegurando um bom rendimento do cloreto de sulfonila desejado (NUNES, 1986). O ponto de fusão do cloreto da 4-metoxichalcona-3-sulfonila, 130-134°C está de acordo com a literatura (135-136°C - CREMLYN et al., 1984).



(21)

Os cloretos de arilsulfonila são em geral, de difícil purificação, sendo muito sensíveis à umidade, a qual leva à sua decomposição. Geralmente são

caracterizados pelo tratamento com reagentes nucleofílicos, como por exemplo, aminas, álcoois, fenóis, hidrazinas e azidas. As sulfonamidas, em particular, após recristalização, são geralmente sólidos cristalinos bem definidos (CORRÊA, 1997). Assim, o cloreto da 4-metoxichalcona (**21**) obtido foi caracterizado através da confirmação da estrutura dos seus derivados sulfonamídicos, através do espectro de infravermelho e de RMN ^1H . Por exemplo, o espectro no infravermelho do composto (**23**) mostrou uma banda em 1659 cm^{-1} (C=O), uma banda em 1595 cm^{-1} (Ar C=C), duas bandas em 1323 cm^{-1} e 1144 cm^{-1} correspondentes às absorções assimétrica e simétrica, respectivamente, do grupamento SO_2 da sulfonamida. Seu espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , apresentou um tripleto em 1,13 ppm referente às metilas (6H), um quarteto em 3,35 ppm referente ao metileno (4H), um singleto em 3,98 ppm, referente ao grupo metoxi (3H), um dubleto em 7,04 ppm referente ao hidrogênio aromático H_9 (1H), um multipletto em 7,48 – 7,70 referente à 4H aromáticos e a 1H olefinicos (H_β), um dubleto em 7,76 ppm referente ao H_α ($J = 15,68\text{ Hz}$), um dubleto em 8,05 referente aos H aromáticos H_1 e H_5 e um singleto em 8,30 ppm referente ao H aromático H_{10} , o qual está mais desblindado devido o grupamento SO_2 , que é um forte retirador de elétrons.

O estudo com chalconas sintéticas demonstrou que as chalconas apresentam a isomeria *E*. Acredita-se que este fato esteja intimamente relacionado ao calor de formação e estabilidade conformacional destes compostos (LÓPEZ et al., 2001). A análise dos deslocamentos químicos dos prótons olefínicos do composto (**23**) permite sugerir que o cloreto de sulfonila (**21**) apresenta configuração *E*, isto pode ser observado através da constante de acoplamento entre H_α - H_β , $J = 15,68\text{ Hz}$, o qual está de acordo com a literatura (CESARIN-SOBRINHO; NETTO-FERREIRA; BRAZ-FILHO, 2001; SANTOS, 2003).

A série de sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona (**22 a 30**) sintetizadas está descrita na Tabela 16. O ponto de fusão e o rendimento do composto (**22**) estão de acordo com a literatura ($140\text{-}141^\circ\text{C}$, 49% - CREMLYN et al., 1984), os compostos (**23**), (**27**) e (**28**) foram descritos em CREMLYN et al., 1991. As sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona (**23 a 30**) foram caracterizados através das análises dos espectros de absorção no infravermelho, dos espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C e das análises elementares.

Tabela 16: Série de sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona (**22** a **30**) com os respectivos rendimentos e pontos de fusão.

Composto	R	Rendimento (%)	Ponto de Fusão (°C)
22		42,95	140,0-144,4
23		40,16	149,8-150,9
24		38,46	158,3-158,8
25		51,79	161,8-165,8
26		42,20	167,2-169,8
27		47,00	200,4-202,6
28		60,98	183,3-185,5
29		51,26	204,9-207,2
30		48,00	218,6-219,4

A estrutura do composto (**26**) foi estabelecida pela análise de raios-X de monocristal (ANDRIGHETTI-FROHNER et al., 2007a, Apêndice 1). Este apresenta a fórmula molecular $C_{23}H_{21}NO_4S$ com sistema cristalino triclinico e grupo espacial P-1. As dimensões da célula unitária são $a = 10,3671(12) \text{ \AA}$, $\alpha = 84,8830(10)^\circ$, $b = 10,3671(8) \text{ \AA}$, $\beta = 68,793(2)^\circ$, $c = 10,7977(14) \text{ \AA}$, $\gamma = 65,3980(10)^\circ$. O volume é $981,11(19) \text{ \AA}^3$ e $Z = 2$. Os índices de discordâncias finais encontrados foram $R_1 =$

0,0472, $wR_2 = 0,1197$. A estrutura molecular do composto (**26**) é apresentada na Figura 1. A análise dessa estrutura molecular em relação aos carbonos C₁₅ e C₁₆ confirma a isomeria *E* do composto.

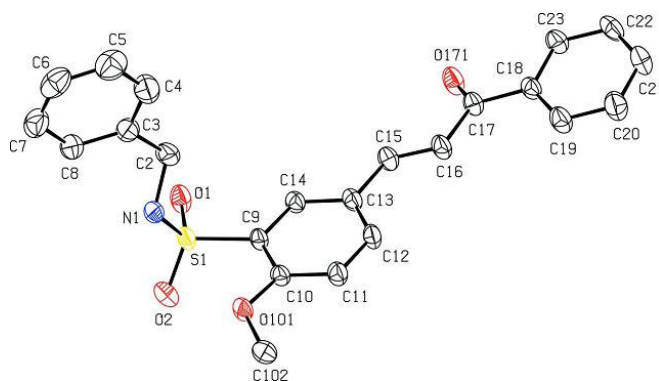


Figura 1: Visão em perspectiva da estrutura molecular do composto *N*-Benzil-2-metoxi-5-(3-oxo-3-fenil-1-propenil)-benzenosulfonamida (**26**). A numeração dos átomos é arbitrária.

O composto (**26**) mostra uma estrutura molecular em forma de V formada pelos braços da sulfonamida e da chalcona com o vértice da molécula ocupado pelo átomo de enxofre.

O braço da chalcona é quase planar, onde o ângulo diedro entre plano do anel C9....C14 e C18....C23 é 10,85 (6)° e plano da cadeia central C13-C15=C16-C17 com respeito ao anel fenil C9....C14 e C18....C23 são 10,4 (1)° e 11,5 (1)°, respectivamente. Esta característica sugere que há deslocalização eletrônica formando um prolongado sistema elétron π conjugado nesta porção, o que está de acordo com a diminuição do comprimento da ligação simples entre C16-C17 [1,471 (3) Å] e o aumento do comprimento da ligação dupla entre C15=C16 [1,322 (3) Å]. Além disso, o grupo metoxi é também quase coplanar com o anel fenil na qual está ligado. A literatura descreve estruturas similares de chalconas (SUBBIAH PANDI et al. 2003) quando o grupo metoxi está na posição *para* em relação a cadeia central.

Na porção da sulfonamida, as distâncias e os ângulos em torno de N1 e C2 estão dentro dos limites esperados encontrados em estruturas similares pesquisadas no CSD V5.28 (The Cambridge Structural Database System, version V5.28) com Mogul (BRUNO et al., 2004). O anel fenil C3....C8 é quase perpendicular ao plano

médio do braço da chalcona, onde o ângulo diedro entre estes dois planos é 85,04 (8)°.

Uma ligação de H intermolecular N–H....O (Tabela 17) promoveu a formação de uma cadeia zig-zag infinita paralela ao eixo cristalográfico [001] (Figura 2), mantendo as moléculas empilhadas nesta direção.

Tabela 17: Comprimento (Å) e ângulo (°) das ligações de hidrogênio do composto **26**

D-H---A	D-H	H---A	D---A	D-H---A
N1-H1---O171 ⁱ	0,84 (3)	2,23 (3)	3,018 (3)	156 (3)

Código de simetria: (i) x,y,z-1

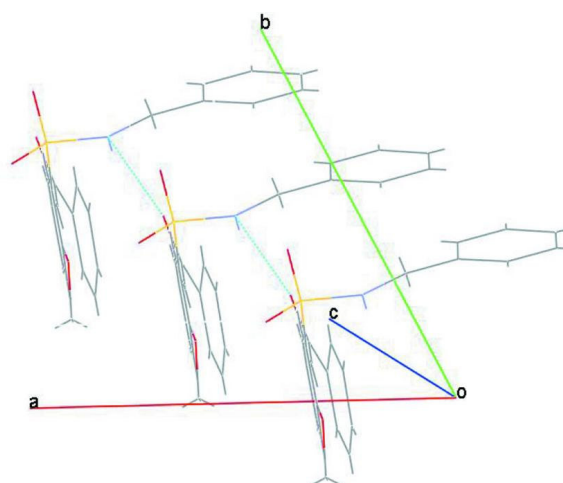


Figura 2: Empacotamento do composto *N*-Benzil-2-metoxi-5-(3-oxo-3-fenil-1-propenil)-benzenosulfonamida (**26**) mostrando as moléculas conectadas através das ligações de hidrogênio representadas pelas linhas tracejadas azul claro.

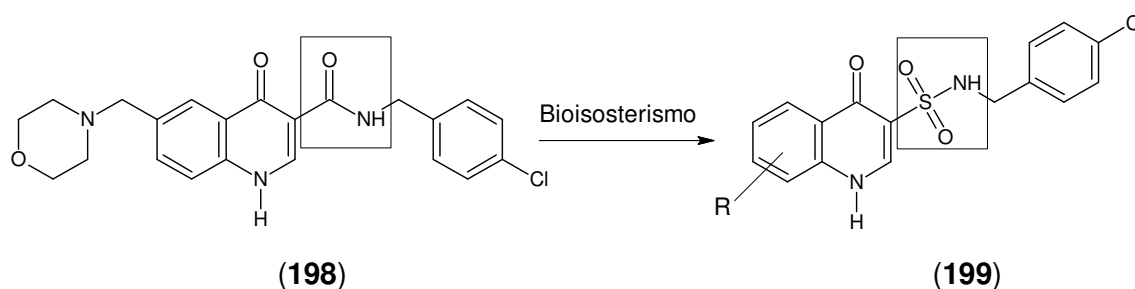
5.1.3 Sulfonamidas derivadas da quinolona e da quinolina

As quinolonas e quinolinas têm atraído a atenção dos químicos orgânicos pois são estruturas importantes para a síntese de compostos com propriedades farmacológicas interessantes (HUANG;LIU, 2002; MICHAEL, 2007), entre elas a atividade antiviral (OIEN et al., 2002; PAROLIN et al., 2003; HARTLINE et al., 2005; SOUZA et al., 2007; SOUZA et al., 2008).

Recentemente foi demonstrado que o composto 4-oxo-diidro-quinolina (**198**)

apresenta uma potente atividade inibitória da replicação dos vírus da família Herpesviridae. Este composto inibe a DNA polimerase viral por um mecanismo diferente dos fármacos usados clinicamente, sendo considerado uma nova classe de compostos antivirais (THOMSEN et al., 2003).

No presente trabalho o composto **(198)** foi escolhido como composto-modelo para a síntese de novos compostos com potenciais atividades antivirais. Optou-se por sintetizar derivados da 4-oxo-(1H)quinolina **(199)**, baseando-se em relações isostéricas onde o grupamento carboxiamida do composto **(198)** foi substituído pelo grupamento sulfonamida no composto **(199)** Esquema 8.



Esquema 8: Relação isostérica entre o composto **(198)** e o composto **(199)**.

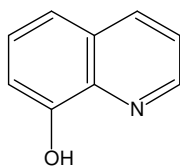
A síntese dos compostos **(199)** foi iniciada através da clorossulfonação dos compostos quinolínicos: 4-oxo-(1H)quinolina, 7-cloro-4-oxo-(1H) R= H, Cl, Br, OH 8-oxi-quinolina.

Durante o procedimento 1 (item **4.1.2.1**) para a síntese dos cloretos de sulfonila das quinolonas foram testadas algumas condições reacionais: HSO₃Cl em excesso (6 equivalentes), diferentes temperaturas entre 60°C e 100°C, diferentes tempos de aquecimento no banho-maria ou mantidos a temperatura ambiente (CREMLYN; SWINBOURNE; YUNG, 1980), diferentes solventes para o isolamento do cloreto do meio reacional, tais como água (NUNES, 1986; WALTER et al., 2004), ácido acético/acetato de etila (1:1) (SHUKUROV et al., 1993), diclorometano (BASSIN ; CREMLYN; SWINBOURNE, 1991). Entretanto, foram encontradas dificuldades na obtenção e caracterização dos respectivos cloretos de sulfonila das quinolonas.

Em relação a clorossulfonação da 8-hidroxi-quinolina **(200)** deve-se considerar, a função fenólica. A reação do fenol com ácido clorossulfônico em temperaturas de -40°C a 0°C forneceu quantidades equimolares dos ácidos 2- e 4-hidroxibenzenossulfônicos, sendo que a velocidade relativa de formação do

composto 2-hidroxibenzenossulfônico em comparação com o 4-hidroxibenzenossulfônico aumentou com a diminuição da temperatura. Experimentos de clorossulfonação realizados com diclorofenóis mostraram que a orientação da clorossulfonação é controlada pela participação dos elétrons do grupo hidroxila. Entretanto, quando a posição *para* estava ocupada por um substituinte, a sulfonação ocorreu na posição orto ao grupo hidroxila. Esses experimentos mostraram que os rendimentos máximos dos cloretos de sulfonila obtidos requerem excesso (cerca de 5 equivalentes) de ácido clorossulfônico em cada caso, devido à condensação do ácido clorossulfônico com o grupo hidroxila fenólico (BASSIN; CREMLYN; SWINBOURNE, 1991).

Apesar das diferentes condições testadas neste trabalho não foi possível obter e caracterizar o cloreto da 8-hidroxi-quinolina.



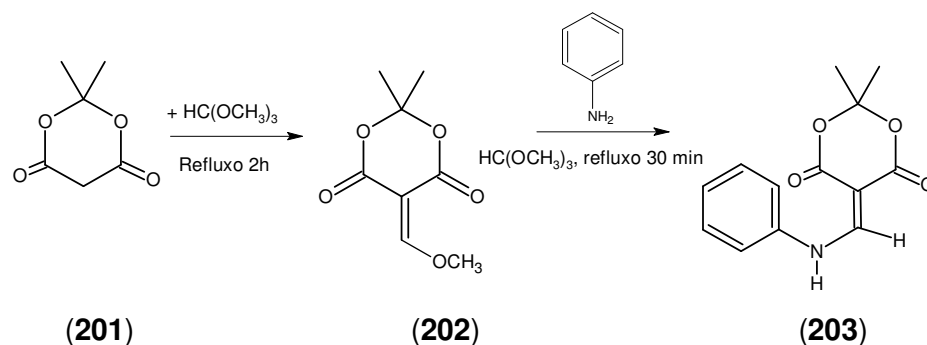
(200)

Desta forma, outra proposta para obtenção das sulfonamidas derivadas da quinolona (item **4.1.2.2**, Procedimento 2) foi o emprego do derivado 5-metoximetileno do ácido de Meldrum (**202**) e da 4-aminobenzenosulfonamida substituída (**34**) como percussores para a síntese da quinolona substituída (Esquema 3 e 4). Com esta proposta, as sulfonamidas derivadas de quinolonas (**36**) apresentam o grupamento sulfonamida na posição 6 do anel quinolínico, que não corresponde a relação isostérica entre o composto (**198**) e o composto (**199**), inicialmente proposta.

O ácido de Meldrum (2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona) (**201**) é um versátil intermediário na síntese orgânica. Esta versatilidade decorre principalmente do seu caráter anfílico que permite um ataque nucleofílico nas posições 4 e 6, e eletrofílico na posição 5 deixando o anel intacto. Os derivados do ácido de Meldrum 5-metileno substituídos são facilmente obtidos pela condensação do ácido de Meldrum com ortoformato de trimetila, dimetilformamida dimetilacetal, imidatos ou dissulfeto de carbono (HUANG; ZHANXIANG, 2002). A alta acidez (pKa de 4,83), a rigidez estérica e a notável tendência de eliminar acetona também contribuem para a sua grande aplicação sintética (SILVA, 2006).

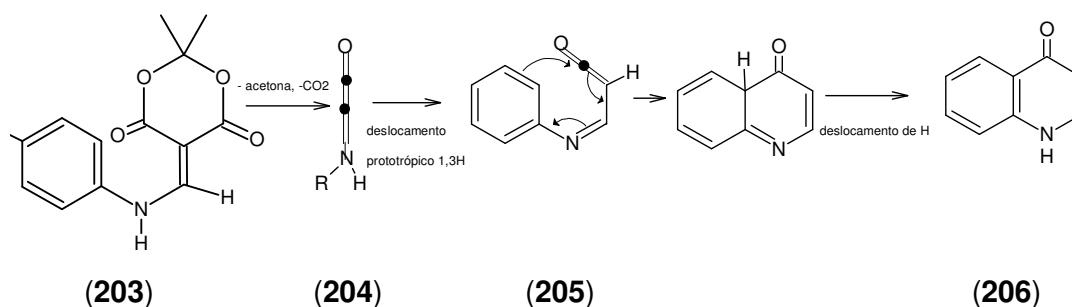
A versatilidade desta rota sintética tem levado à preparação de diversos núcleos heterocíclicos, como por exemplo, quinolonas, pirimidinas, naftidirinas e pirazol (GABER; McNAB, 2001; PENG et al., 2002; PENNING et al., 2006).

A formação das 4-quinolonas por pirólise dos derivados arilaminometilênico do ácido de Meldrum em solução são conhecidos desde 1969 e em fase gasosa desde 1983 (GABER; McNAB, 2001). O derivado aminometilênico pode ser obtido pela condensação de uma amina aromática primária com o composto 5-(metoximetileno)-2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona (**202**), gerado *in situ* a partir da reação do ácido de Meldrum (**201**) com ortoformato de trimetila (MADRID et al., 2005) (Esquema 9).

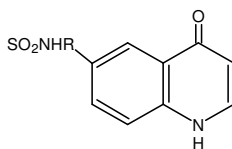


Esquema 9: Rota sintética dos derivados arilaminometilênico do ácido de Meldrum.

Na pirólise do derivado aminometilênico do ácido de Meldrum (**203**) em solução ou em fase gasosa, ocorre a perda de acetona e dióxido de carbono gerando metilenoceteno (**204**), o qual por um processo de deslocamento prototrópico 1,3 forma o iminoceteno (**205**), que sofre em seguida uma reação de eletrociclicização por transferência interna de hidrogênio levando à produtos de ciclização, como a 4-quinolona (**206**), Esquema 10 (McNAB, 2004).

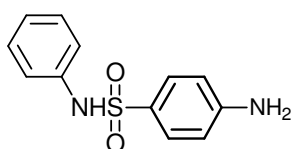


Esquema 10: Síntese da quinolina através da pirólise do derivado aminometilênico do ácido de Meldrum.

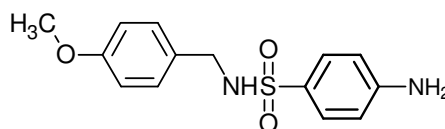


(36)

As 4-aminobenzenosulfonamida substituídas (**207**) e (**208**) obtidas foram submetidas à reação de condensação com o 5-metoximetilênico do ácido de Meldrum (**202**) formando os adutos (**209**) e (**210**) com rendimento de 73 e 61%, respectivamente.



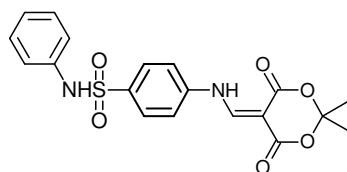
(207)



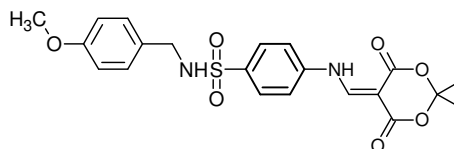
(208)

Os adutos foram caracterizados através das análises dos espectros de absorção no infravermelho, dos espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C e das análises elementares.

O espectro de RMN ^1H do composto (**210**) contribui para a elucidação da estrutura proposta pela presença dois dubletos com constante de acoplamento de $J=13$ Hz que correspondem aos prótons olefínico (8,59 ppm) e amínico (11,24 ppm) do aduto. Em 8,04 ppm apresentou um tripleto referente ao grupo NH da sulfonamida e em 1,60 ppm um singleto referente às metilas (6H), indicando que as mesmas encontram-se no mesmo ambiente químico como pode ser observado na Figura 3.



(209)



(210)

A condição padrão de termólise em solução para a síntese de 4-quinolonas e de sistemas heterocíclicos relacionados quando se usa éter difenílico em ebulição como solvente é de 259°C (GABER; McNAB, 2001). A termociclicização dos adutos

(209) e (210) em éter difenílico nesta temperatura, durante 5 min, conduziu a uma mistura de produtos de difícil separação. Assim, foram testadas condições mais brandas de termólise (cerca de 160 - 170 °C) com o intuito de aperfeiçoar a obtenção do produto durante o procedimento da termociclização dos adutos. Também foi testado o prolongamento do aquecimento por cerca de 10 min a 250 °C e o procedimento de purificação por coluna cromatográfica de sílica. Entretanto, não foi possível obter os compostos puros e novos experimentos serão necessários a fim de otimizar esse processo de obtenção das sulfonamidas derivadas de quinolonas por esta rota sintética.

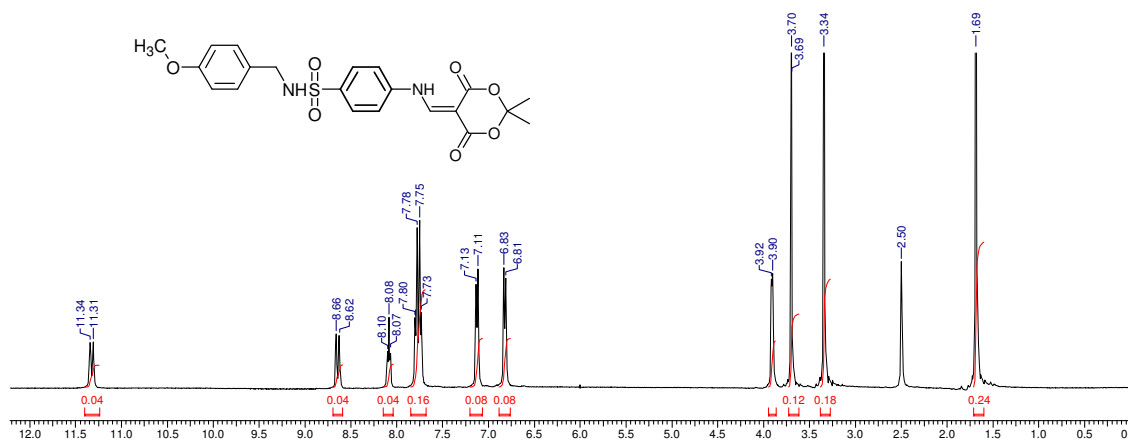


Figura 3: Espectro de RMN ^1H em DMSO- d_6 do composto 4-[(2,2-dimetil-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-ilideno)metilamino]-*N*-(-metoxibenzil)benzenosulfonamida (210).

Devido à urgência em obter novos compostos para realizar os testes de atividade antiviral e a proximidade do estágio de doutorado no exterior não foi dada continuidade a esse procedimento de síntese e optou-se em comprar o cloreto da quinolina-8-sulfonila (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e sintetizar uma série de sulfonamidas derivadas dessa quinolina (item 4.1.2.3, Procedimento 3).

A série de sulfonamidas derivadas da quinolina (38 a 48) sintetizadas está descrita na Tabela 18. As sulfonamidas derivadas da quinolina foram caracterizadas através das análises dos espectros de absorção no infravermelho, dos espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C e das análises elementares.

Tabela 18: Série de sulfonamidas derivadas de quinolinas (**38** a **48**) com os respectivos rendimentos e pontos de fusão.

Composto	Rendimento (%)	Ponto de Fusão (°C)	Ponto de Fusão (°C) literatura
38	76	105-106	-
39	70	127-129	119-120 ^a
40	86	132-134	-
41	70	111-115	-
42	75	105-107	-
43	69	178-179	179-180 ^b
44	51	124-126	-
45	68	127-129	-
46	79	154-155	157-158 ^b
47	72	198-200	197-198 ^b
48	70	224-226	-

^a BUCHMANN; SCHALINATUS (1962); ^b VINOKUROVA; FELDMAN (1968).

O espectro de RMN ¹H em CDCl₃ do composto (**44**) (Figura 4) permite exemplificar a elucidação da estrutura das sulfonamidas derivadas de quinolina. Este apresentou um tripleto em 2,65 ppm referente ao metileno (2H), um quarteto em 3,09 ppm referente ao metileno (2H), um singleto em 3,75 ppm referente ao grupo metoxi (3H), um tripleto em 6,25 ppm referente ao referente ao grupo NH da sulfonamida e que desaparece na presença de D₂O, duplo dubleto em 6,62 ppm referente aos H₇ e H₈ do grupo metoxi-fenil, duplo dubleto em 6,80 ppm referentes aos H₉ e H₁₀ do grupo metoxi-fenil, duplo dubleto em 7,42 ppm referente H₂ do anel quinolínico, duplo dubleto em 7,60 referente ao H₅ do anel quinolínico, duplo dubleto em 8,09 ppm referente ao H₄ do anel quinolínico, duplo dubleto em 8,22 ppm referente ao H₃ do anel quinolínico, duplo dubleto em 8,35 referente ao H₆ do anel quinolínico e duplo dubleto em 8,63 ppm referente ao H₁ do anel quinolínico.

A presença de uma banda em 3219 cm⁻¹ no espectro de infravermelho relativa ao estiramento N-H da porção sulfonamídica e de duas bandas em 1322 cm⁻¹ e 1165 cm⁻¹ correspondentes às absorções assimétrica e simétrica, respectivamente, do grupamento SO₂ da sulfonamida também contribui para a identificação do

composto (44).

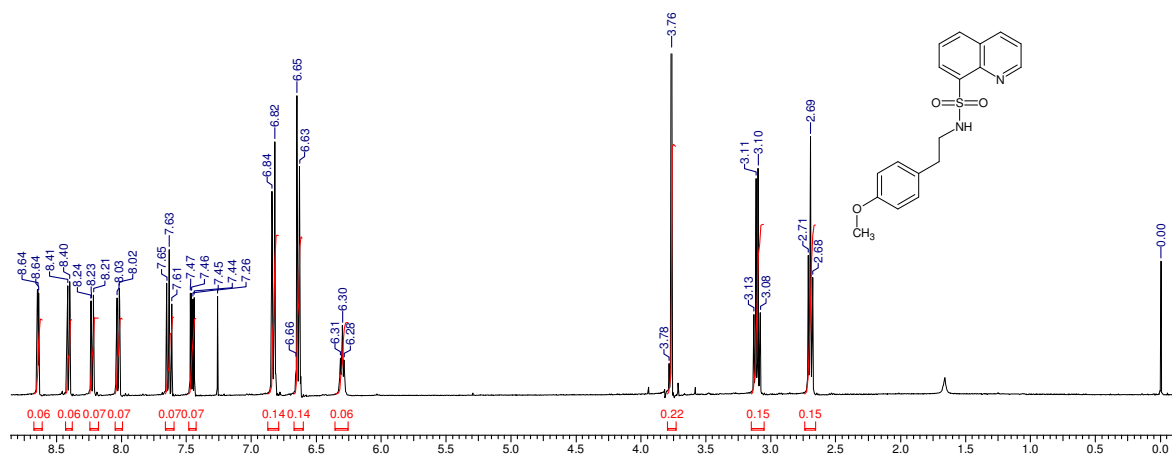


Figura 4: Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 do composto *N*-[2-(4-metoxifenil)etil]-8-quinolinassulfonamida (44).

O ponto de fusão do composto (39) apresentou uma pequena divergência com a literatura, entretanto, os dados espectrais e de difração de raios-X de monocristal (Figura 5) confirmam a pureza do composto. A estrutura do composto (39) foi estabelecida por difração de raios-X de monocristal (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2006, Apêndice 1). Este apresenta a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ com sistema cristalino monoclinico e grupo espacial $\text{P2}_1=\text{n}$. As dimensões da célula unitária são $a = 10,142 (2) \text{ \AA}$, $b = 9,980 (2) \text{ \AA}$, $\beta = 100,25 (2)^\circ$, $c = 14,428 (2)$. O volume é $1437,1(5) \text{ \AA}^3$ e $Z = 4$. Os índices de discordâncias finais encontrados foram $R_1 = 0,078$, $wR_2 = 0,236$.

As principais características da estrutura molecular do composto (39) são o ângulo de torção C1-N1-S1-C10 entre o anel quinolínico e o anel benzenóide de $-63,1(4)^\circ$, que ilustra a não planaridade da molécula e uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio amídico (NH) e o nitrogênio quinolínico (Tabela 19 e Figura 5).

Tabela 19. Comprimento (\AA) e ângulo ($^\circ$) das ligações de hidrogênio do composto (39).

D-H---A	D-H	H---A	D---A	D-H---A
N1-H1N---N2	0,84	2,32	2,929	130

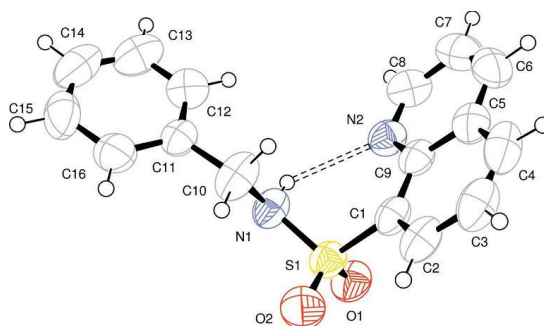


Figura 5: Visão em perspectiva da estrutura molecular do composto *N*-benzil-8-quinolinassulfonamida (**39**). A numeração dos átomos é arbitrária.

As sulfonamidas derivadas de quinolina (**41**) e (**46**) também tiveram suas estruturas estabelecidas por difração de raios-X de monocristal e estão descritas em Andrighetti-Fröhner et al. (2007b) e Andrighetti-Fröhner et al. (2007c), respectivamente (Apêndice 1).

5.1.4 Sulfonatos derivados da 8-hidroxi-quinolina

Neste trabalho foram sintetizados os sulfonatos derivados da 8-hidroxi-quinolina (**49**) e (**50**). Esses compostos foram caracterizados através das análises dos espectros de absorção no infravermelho, dos espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C e das análises elementares.

A estrutura do composto (**50**) foi estabelecida pela análise de raios-X de monocristal (SILVA et al., 2006, Apêndice 1). Este apresenta a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{NO}_3\text{S}$ com sistema cristalino monocíclico e grupo espacial $\text{P}2_1/\text{c}$. As dimensões da célula unitária são $a = 7,842(1) \text{ \AA}$, $b = 25,536(3) \text{ \AA}$, $\beta = 107,87(1)$, $c = 7,642(1) \text{ \AA}$. O volume é $1456,5(3) \text{ \AA}^3$ e $Z = 4$. Os índices de discordâncias finais encontrados foram $R_1 = 0,045$, $wR_2 = 0,132$. A estrutura molecular do composto (**50**) é apresentada na Figura 6.

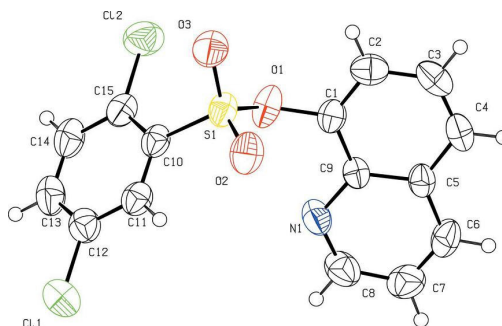


Figura 6: Visão em perspectiva da estrutura molecular do composto quinolin-8-il-2,5-diclorobenzenosulfonato (**50**). A numeração dos átomos é arbitrária.

As principais características da estrutura molecular do composto (**50**) são o ângulo de torção C1-O1-S1-C10 de 146,2 (3)°, o qual ilustra a não planaridade da molécula e uma ligação de hidrogênio intramolecular entre o átomo H do C3 do anel quinolínico e o átomo de O do grupo sulfonil (H---O = 2,54 Å), formando uma rede tridimensional (Tabela 20 e Figura 7).

Tabela 20. Comprimento (Å) e ângulo (°) das ligações de hidrogênio do composto (**50**).

D-H---A	D-H	H---A	D---A	D-H---A
C3-H3---O2 ⁱ	0,93	2,54	3,294 (4)	138

Código de simetria: (i) x, -y+1/2, z +1/2)

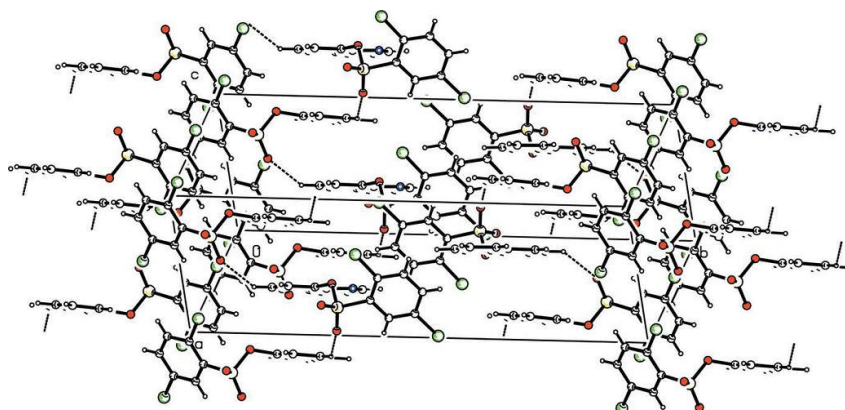


Figura 7: Empacotamento do composto quinolin-8-il-2,5-diclorobenzenosulfonato (**50**) mostrando as ligações de hidrogênio representadas pelas linhas tracejadas.

5.1.5 Síntese orgânica e atividade antiviral

A síntese orgânica tem contribuído significativamente desenvolvimento de novos fármacos, sendo responsável por cerca de 75% dos fármacos existentes no mercado farmacêutico (CECHINEL FILHO et al., 2003) e várias pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos antivirais têm sido realizados com base em substâncias sintéticas (KANEKO et al., 2001; MARCELETTI, 2002, EKBLAD et al., 2006; SOUZA et al., 2007; SOUZA et al., 2008).

No desenvolvimento de novos fármacos, existem dois métodos para identificar os compostos que apresentam atividade antiviral. A primeira envolve a triagem aleatória de diferentes compostos, que consiste na busca por uma substância ativa, sem nenhum conhecimento prévio de que estruturas químicas poderão apresentar atividade. A segunda abordagem é a de sintetizar compostos que são projetados para atuar em um alvo viral específico. Esse alvo, representado por uma biomacromolécula – enzima ou receptor, propriamente dito, pode ter sua estrutura molecular conhecida ou não (KINCHINGTON et al., 1995)

Desta forma, com o intuito de contribuir com a pesquisa de novos fármacos antivirais foi realizado um processo de triagem aleatória da potencial atividade antiviral *in vitro* dos compostos sintetizados neste trabalho (sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona, sulfonamidas derivadas da quinolina, adutos do ácido de Meldrum e sulfonatos derivado da 8-hidroxi-quinolina) e de outros 150 compostos sintéticos.

5.2 AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL

Os métodos comumente utilizados para a avaliação da atividade antiviral *in vitro* são baseados na diferente habilidade dos vírus de se replicarem em células cultivadas. Alguns vírus podem causar efeito citopático ou formar placas de lise, outros são capazes de realizar funções especializadas ou provocar transformações nas células. A replicação dos vírus em cultura de células pode também ser monitorada pela detecção de determinados elementos virais, tais como DNA ou RNA viral ou polipeptídios, quando os vírus não produzem efeito citopático nas células. Assim sendo, o teste antiviral selecionado pode ser baseado na inibição do efeito citopático viral, na redução ou inibição da formação de placas de lise, na redução do título viral ou de outras funções virais (VLITINCK; VANDEN BERGHE, 1998).

A segurança é um dos parâmetros de grande importância no desenvolvimento de fármacos antivirais. Os testes de toxicidade celular fornecem as primeiras informações sobre a segurança dos compostos em teste. Muitas moléculas promissoras são descartadas logo de início, devido à sua citotoxicidade. Um composto antiviral deve ser mais tóxico para os vírus do que para as células (FLINT et al., 2000). Devido a isso, os resultados dos estudos *in vitro* geralmente são expressos como IS (= Índice de Seletividade), valor que expressa a relação entre a concentração da amostra, que é tóxica para 50% do tapete celular (CC_{50}) e a concentração efetiva, que é a concentração que protege 50% do tapete celular da infecção viral (TAKESHIMA, 1992).

O índice de seletividade de um composto indica quão promissora é a atividade antiviral do composto em questão. Geralmente, o índice de seletividade de um composto deverá ser maior do que 100, nos ensaios *in vitro*, antes que ele seja submetido a desenvolvimentos adicionais (KINCHINGTON et al., 1995) e maior do que 100 a 1000 para indicar um efeito útil na inibição viral em experimentos com animais (TAKESHIMA, 1992).

O índice de seletividade também permite comparar a potência de um novo composto antiviral frente a fármacos antivirais aprovados para uso clínico (VLIETINCK, A.J. et al., 1997).

5.2.1 Determinação dos títulos virais

Os títulos infecciosos das soluções-estoques virais foram determinados conforme as metodologias descritas no item 4.2.5. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 21.

Tabela 21: Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados.

Vírus	Títulos
HSV-1 cepa KOS	$5,3 \times 10^7$ PFU/mL
HSV-1 cepa 29R	$8,8 \times 10^5$ PFU/mL
HSV-1 cepa KOS 321	$1,3 \times 10^8$ PFU/mL
HSV-1 cepa gC ⁻ 39	$4,2 \times 10^7$ PFU/mL
HSV-1 MP	$1,2 \times 10^7$ PFU/mL
HSV-2 cepa 333	$2,3 \times 10^8$ PFU/mL
Rotavírus SA-11	$3,4 \times 10^7$ FFU/mL
RSV cepa A2	$1,0 \times 10^7$ PFU/mL

5.2.2 Triagem da potencial atividade antiviral realizado no Laboratório de Virologia Aplicada/UFSC

Inicialmente, no processo de avaliação biológica dos compostos (Esquema 7 do item **4.2.6**) foi realizado o teste de citotoxicidade dos compostos a uma concentração de 250 μ M e em duplicata, através do ensaio do MTT.

Os compostos que foram citotóxicos nessa concentração foram testados, em uma menor concentração. Assim os compostos **(58)**, **(139)** e **(143)** não foram citotóxicos em concentrações menores que 125 μ M; os compostos **(23)**, **(64)**, **(77)**, **(80)** não foram citotóxicos em concentrações menores que 62,5 μ M; os compostos **(22)**, **(24)** a **(28)** não foram citotóxicos em 31,25 μ M e os compostos **(29)** e **(30)** em 15,62 μ M. Os compostos **(73)** a **(76)**, **(78)**, **(79)**, **(123)**, **(127)** e **(128)** foram citotóxicos, mesmo em concentrações muito baixas e por isso não foram submetidos aos testes de avaliação da atividade antiviral. O composto **(88)** não foi testado por ser insolúvel no meio de cultura. Os demais compostos não foram citotóxicos na concentração de 250 μ M.

Os compostos que não foram citotóxicos foram avaliados em relação sua potencial atividade antiviral contra o RV-SA11 e o HSV-1 cepa KOS e cepa 29R, através do Ensaio colorimétrico do MTT. Todos os compostos foram testados em uma única concentração não citotóxica, em duplicata e a concentração de DMSO não excedeu 1%.

Na avaliação da atividade antiviral foram realizados dois diferentes tratamentos: o simultâneo e o pós-tratamento.

As sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona apresentaram uma fraca ação inibitória da replicação dos vírus: RV-SA11, HSV-1 cepa KOS e cepa 29R para o tratamento simultâneo e o pós-tratamento, através do ensaio do MTT. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 22.

Os compostos derivados da aziridina apresentaram baixas porcentagens de inibição da replicação dos vírus: RV-SA11, HSV-1 cepa KOS e cepa 29R para o tratamento simultâneo e o pós-tratamento, através do ensaio do MTT (Tabela 23).

Tabela 22: Resultados da triagem da potencial atividade anti-HSV-1 e anti-rotavírus das sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona (**22** a **30**), através do ensaio do MTT.

Compostos	Concentração (μ M)	% de Inibição					
		Tratamento simultâneo			Pós-tratamento		
		HSV-1		RV	HSV-1		RV
		KOS	29R	SA11	KOS	29R	SA11
22	31,25	SI	43,3	SI	7,2	24,1	SI
23	62,5	11,4	31,4	35,4	17,3	40,4	SI
24	31,25	18,1	SI	SI	9,4	SI	SI
25	31,25	1,4	38,9	SI	SI	19,3	16,7
26	31,25	SI	15,9	SI	SI	SI	SI
27	31,25	SI	SI	27,0	18,4	SI	SI
28	31,25	25,3	36,2	SI	SI	SI	SI
29	15,62	13,5	SI	SI	SI	SI	10,4
30	15,62	9,9	SI	SI	SI	SI	SI

SI= sem inibição. Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

Tabela 23: Resultados da triagem da potencial atividade anti-HSV-1 e anti-rotavírus dos compostos derivados da aziridina, através do ensaio do MTT.

Compostos	Concentração (μ M)	% de Inibição					
		Tratamento simultâneo			Pós-tratamento		
		HSV-1		RV	HSV-1		RV
		KOS	29R	SA11	KOS	29R	SA11
52	125	SI	11,6	4,9	SI	SI	SI
53	125	SI	17,7	25,2	1,4	21,6	28,0
54	125	SI	9,0	SI	SI	10,8	32,8
55	125	SI	24,9	17,5	SI	18,4	40,6
56	125	SI	7,9	SI	SI	36,7	30,2
57	125	SI	9,5	SI	SI	30,1	SI

SI= sem inibição. Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

Os resultados obtidos na triagem da atividade antiviral dos compostos

derivados das imidas cíclicas, das sulfonamidas derivadas de succinimidas, das sulfonamidas derivadas maleimidas e das sulfonamidas derivadas de *N*-fenilftalimida e da *N*-fenilnaftalimida estão descritos na Tabela 24 e 25. Os compostos **(59)**, **(60)**, **(63)**, **(68)**, **(77)**, **(80)** e **(84)** não inibiram a replicação dos vírus: RV-SA11, HSV-1 cepa KOS e cepa 29R para o tratamento simultâneo e o pós-tratamento, através do ensaio do MTT. Os demais compostos apresentaram uma fraca ação inibitória da replicação dos vírus estudados (RV-SA11, HSV-1 cepa KOS e cepa 29R) tanto para o tratamento simultâneo como para o pós-tratamento.

Tabela 24: Resultados da triagem da potencial atividade anti-HSV-1 e anti-rotavírus dos compostos derivados das imidas cíclicas, das sulfonamidas derivadas de succinimidas, das sulfonamidas derivadas de maleimidas, através do ensaio do MTT.

Compostos	Concentração (μ M)	% de Inibição					
		Tratamento simultâneo			Pós-tratamento		
		HSV-1		RV	HSV-1		RV
		KOS	29R	SA11	KOS	29R	SA11
58	62,5	SI	28,9	SI	SI	48,2	9,7
59	125	SI	SI	SI	SI	SI	SI
60	125	SI	SI	SI	SI	SI	SI
61	125	13,6	SI	SI	4,7	23,5	21,0
62	125	3,4	1,6	SI	1,4	13,8	12,9
63	125	SI	SI	SI	SI	SI	SI
64	31,2	SI	16,9	SI	SI	17,4	29
65	125	2,4	27,6	SI	2,8	27,1	SI
66	125	11,7	16,7	SI	5,1	23,4	15,1
67	125	SI	33,4	35,4	SI	SI	25,8
68	125	SI	SI	SI	SI	SI	SI
69	125	20,1	SI	SI	1,8	SI	SI
70	125	19,4	SI	SI	24,9	3,0	SI
71	125	19,0	SI	35,1	SI	15,6	SI
72	125	SI	6,6	SI	11,2	SI	SI
77	31,2	SI	SI	SI	SI	SI	SI
80	31,1	SI	SI	SI	SI	SI	SI

SI= sem inibição. Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

Tabela 25: Resultados da triagem da potencial atividade anti-HSV-1 e anti-rotavírus dos compostos derivados das sulfonamidas derivadas de *N*-benzilftalimida e da *N*-benzilnaftalimida, através do ensaio do MTT.

Compostos	Concentração (μ M)	% de Inibição					
		Tratamento simultâneo			Pós-tratamento		
		HSV-1		RV	HSV-1		RV
		KOS	29R	SA11	KOS	29R	SA11
81	125	SI	22,0	13,6	SI	SI	SI
82	125	7,2	6,6	SI	SI	17,9	18,3
83	125	10,5	20,9	30,8	SI	42,1	37,5
84	125	SI	SI	SI	SI	SI	SI
85	125	15,2	26,5	SI	SI	37,3	SI
86	125	20,2	12,7	18,6	25,9	21,8	9,4
88	125	15,2	11,1	SI	SI	18,6	SI
89	125	SI	1,1	SI	SI	2,9	3,8
90	125	SI	9,5	SI	SI	9,16	9,4

SI= sem inibição. Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

Os estudos da atividade antiviral dos compostos descritos nas Tabelas 22, 23, 24 e 25 não foram aprofundados, pois as baixas porcentagens de inibição da replicação viral verificadas, não são consideradas promissoras na pesquisa de novos fármacos antivirais.

Os resultados obtidos na triagem da atividade antiviral dos compostos derivados dos adutos do ácido de Meldrum estão descritos na Tabela 26. O composto (**98**) apresentou resultados promissores na inibição da replicação do vírus HSV-1 cepa 29R com 96,6% e 90,1% de inibição da replicação viral no tratamento simultâneo e no pós-tratamento, respectivamente. Esse composto apresentou uma baixa porcentagem de inibição da replicação do HSV-1 cepa KOS e não inibiu a replicação do RV-SA11. Os compostos (**107**) e (**108**) apresentaram resultados promissores na inibição da replicação do vírus RV-SA 11, apresentando $\geq 60\%$ de inibição e baixa porcentagem de inibição da replicação do HSV-1.

Tabela 26: Resultados da triagem da potencial atividade anti-HSV-1 e anti-rotavírus dos adutos do ácido de Meldrum, através do ensaio do MTT.

Compostos	Concentração (μ M)	% de Inibição					
		Tratamento simultâneo			Pós-tratamento		
		HSV-1		RV	HSV-1		RV
		KOS	29R	SA11	KOS	29R	SA11
91	125	21	1,8	SI	2,53	25,9	26,8
92	125	SI	SI	SI	SI	35,5	5,0
93	125	6,0	44,4	SI	16,8	10,0	SI
94	125	18,6	16,5	SI	43,7	12,8	SI
95	125	14,8	57,2	31,7	33,9	26,1	SI
96	125	18,6	38,4	SI	28,7	15,2	SI
97	125	19,7	27,1	SI	21,1	15,3	SI
98	125	12,5	96,6	SI	18,4	90,1	SI
99	125	10,3	39,9	SI	10,8	21,9	SI
100	125	33,6	39,8	24,6	29,8	8,1	45,4
101	125	25,3	25,5	30,1	27,2	13,3	49,6
102	125	31,8	51,8	25,3	16,8	18,9	2,7
103	125	18,8	14,8	SI	45,6	26,1	SI
104	125	12,4	33,6	29,9	34,6	12,9	48,7
105	125	28,6	55,0	SI	56,1	13,9	SI
106	125	14,1	40,3	SI	37,0	16,4	SI
107	125	SI	2,4	21,5	SI	7,8	60,3
108	125	SI	21,5	41,7	2,5	25,3	59,7
109	125	11,4	14,5	SI	32,5	14,9	SI
110	125	11,3	30,9	26,5	31,1	12,1	SI
111	125	SI	SI	27,5	7,9	12,0	52,5
112	125	20,2	22,9	SI	43,2	33,4	SI
113	125	4,2	10,3	SI	36,4	16,5	SI
114	125	23,7	57,6	SI	48,7	56,1	SI
115	125	38,4	40,4	SI	35,1	34,3	SI
116	125	11,3	5,4	SI	29,6	2,39	SI
117	125	16,2	22,8	SI	11,9	5,8	SI

SI= sem inibição. Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

Os resultados obtidos na triagem da atividade antiviral dos compostos tiazolpirimidinona e das naftiridinas estão descritos na Tabela 27. Os compostos

(121) e (124), uma tiazolpirimidinona e uma naftiridina, respectivamente, apresentaram resultados promissores na inibição da replicação do vírus RV-SA 11, apresentando $\geq 60\%$ de inibição. Entretanto, não inibiram a replicação do HSV-1.

Tabela 27: Resultados da triagem da potencial atividade anti-HSV-1 e anti-rotavírus dos compostos tiazolpirimidinona e das naftiridinas através do ensaio do MTT.

Compostos	Concentração (μM)	% de Inibição					
		Tratamento simultâneo			Pós-tratamento		
		HSV-1		RV	HSV-1		RV
		KOS	29R	SA11	KOS	29R	SA11
118	125	26,1	26,7	19,2	37,3	16,1	SI
119	125	31,1	15,3	34,3	31,9	25,3	17,0
120	125	35,1	11,9	SI	10,9	28,9	SI
121	125	SI	SI	90,2	SI	SI	76,5
122	125	SI	SI	15,79	SI	SI	21,1
124	125	SI	SI	47,6	SI	SI	68,8
125	125	23,5	SI	SI	29,6	30,1	9,8
126	125	32,8	30,2	48,9	25,0	16,8	33,2
129	125	SI	14,3	SI	SI	43,3	17,7
130	125	10,3	49,6	SI	10,7	21,9	SI
131	125	20,2	3,8	SI	SI	SI	SI
132	125	SI	6,9	4,21	3,6	28,3	23,9
133	125	18,6	44,4	32,3	25,8	13,8	8,9
134	125	15,3	7,9	SI	18,1	4,5	SI

SI= sem inibição. Os valores representam a média de dois experimentos independentes. Os resultados promissores estão em negrito.

Os resultados obtidos na triagem da atividade antiviral dos compostos das quinolinas e de outros compostos estão descritos na Tabela 28. O composto (**140**), *N*-(6-aminopiridin-2-il)acetamida, apresentou uma fraca ação inibitória da replicação dos vírus estudados (RV-SA11, HSV-1 cepa KOS e cepa 29R) tanto para o tratamento simultâneo e como para o pós-tratamento, não sendo considerado promissor na pesquisa de novos fármacos antivirais.

Tabela 28: Resultados da triagem da potencial atividade anti-HSV-1 e anti-rotavírus das quinolinas e de diferentes compostos, através do ensaio do MTT.

Compostos	Concentração (μ M)	% de Inibição					
		Tratamento simultâneo			Pós-tratamento		
		HSV-1		RV	HSV-1		RV
		KOS	29R	SA11	KOS	29R	SA11
135	125	14,6	43,3	SI	33,7	11,2	SI
136	125	SI	6,6	SI	5,2	9,6	SI
137	125	24,9	7,9	12,6	30,8	5,3	1,6
138	125	SI	SI	SI	SI	SI	SI
139	62,5	SI	29,4	25,9	SI	16,7	11,0
140	125	8,9	22,0	24,4	26,7	7,4	SI
141	125	SI	SI	44,3	SI	SI	60,8
142	125	SI	SI	26,1	SI	SI	43,1
143	62,5	SI	SI	SI	SI	SI	SI
144	125	SI	SI	SI	SI	SI	SI

SI= sem inibição. Os valores representam a média de dois experimentos independentes. Os resultados promissores estão em negrito.

O composto (**141**), uma 2,5-diclorobenzenosulfonamida contendo o núcleo 5-etil-1,3,4-tiadiazol apresentou resultado promissor na inibição da replicação do vírus RV-SA11, no pós-tratamento, apresentando $\geq 60\%$ de inibição. Enquanto que a mesma sulfonamida contendo o núcleo metiltiazol apresentou 26,1% e 43,1 % de inibição da replicação do vírus RV-SA11, tratamento simultâneo e no pós-tratamento, respectivamente. Ambos os compostos não inibiram a replicação do HSV-1 (Tabela 28).

A chalconas (**143**) e (**144**) não inibiram a replicação dos vírus: RV-SA11, HSV-1 cepa KOS e cepa 29R para o tratamento simultâneo e o pós-tratamento, através do ensaio do MTT (Tabela 28).

5.2.2.1 Potencial atividade anti-rotavírus

Os compostos (**107**), (**108**), (**121**), (**124**) e (**141**) apresentaram resultados promissores na inibição da replicação do vírus RV-SA11, apresentando $\geq 60\%$ de inibição. Esses compostos foram submetidos a uma nova avaliação da citotoxicidade

e da atividade anti-rotavírus, utilizando a diluição seriada de cada composto (razão 1:2) conforme Esquema 7 do item 4.2.6, a fim de se determinar os valores de CC_{50} e a CE_{50} , respectivamente (Tabela 29). Com os valores de CC_{50} e de CE_{50} , foi possível calcular os índices de seletividade ($IS = CC_{50} / CE_{50}$).

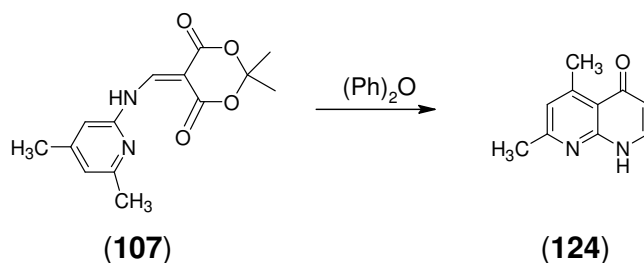
Tabela 29: Resultados da citotoxicidade e da atividade anti-rotavírus (RV-SA11) dos compostos testados através do ensaio do MTT.

Compostos	CC_{50} (μM)	CE_{50} (μM)	IS
Pós-tratamento			
107	> 250	$112,3 \pm 23,8$	2
108	> 250	$125 \pm 15,2$	2
121	> 250	$118,5 \pm 13,9$	2
124	> 250	$57,5 \pm 15,9$	4
141	> 250	$90,0 \pm 38,2$	3

Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. IS = Índice de seletividade.

Os compostos (**107**), (**108**), (**121**), (**124**) e (**141**) demonstraram melhores resultados no pós-tratamento.

Em relação aos compostos (**107**) ($IS = 2$) e (**124**) ($IS = 4$) verificou-se, que o processo de termociclicização do aduto (**107**) no composto (**124**) (Esquema 12) levou a um aumento da atividade anti-rotavírus, que pode ser verificado pelo discreto aumento do IS.

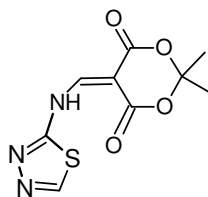


Esquema 11: Termólise do aduto (**107**).

5.2.2.2 Potencial atividade anti-herpética

No processo de triagem da potencial atividade antiviral realizado no Laboratório de Virologia Aplicada/UFSC foi identificado que o composto (**98**) (2,2-

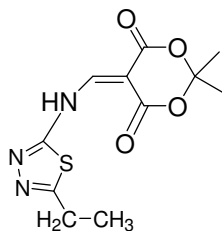
dimetil-5-[(1,3,4-tiadiazol-2-amino)metileno]-1,3-dioxane-4,6-dione) apresentou resultados promissores na inibição da replicação do vírus HSV-1 cepa 29R, que é resistente ao aciclovir, sugerindo que este composto apresenta um mecanismo de ação diferente daquele do aciclovir (Tabela 26). Assim, esse composto foi submetido a avaliação da citotoxicidade e a confirmação da atividade anti-herpes (HSV-1 cepa 29R), utilizando a diluição seriada do composto (razão 1:2), conforme Esquema 7 do item **4.2.6**, a fim de determinar os valores de CC_{50} e a CE_{50} , respectivamente.



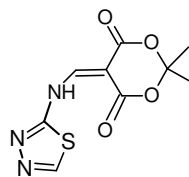
(98)

O composto **(98)** apresentou um valor de $IS > 23$ e $IS > 36$, para o tratamento simultâneo e pós-tratamento, respectivamente (Tabela 30), confirmando a atividade antiviral detectada no processo de triagem. Esta atividade também foi confirmada pelo Método de redução de formação de placas de lise, apresentando um valor de $IS > 14$ ($CC_{50} > 1000 \mu M$ e $CE_{50} = 70,4 \pm 7,3 \mu M$).

O composto **(98)** é um derivado 2-aminotiadiazólico do ácido de Meldrum apresentando o núcleo 1,3,4-tiadiazol em sua estrutura. A presença do grupo etil no carbono 5 do núcleo tiadiazólico, como ocorre no composto **(97)**, levou a uma acentuada diminuição da atividade antiviral, apresentado 27,1% e 15,3% de inibição da replicação do HSV-1 cepa 29R no tratamento simultâneo e no pós-tratamento, respectivamente.



(97)



(98)

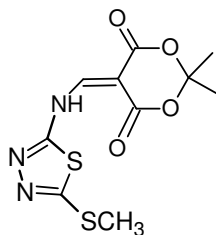
Tabela 30: Resultados da citotoxicidade e da atividade anti-herpes (HSV-1 cepa 29R) do composto (**98**), através do ensaio do MTT.

Compostos	CC ₅₀ (μM)	Tratamento			
		Simultâneo		Pós-tratamento	
		CE ₅₀ (μM)	IS	CE ₅₀ (μM)	IS
98	> 1000	43,3 ± 7,6	23	27,6 ± 1,4	36
Aciclovir	> 250	*	-	*	-

* As porcentagens de inibição obtidas foram menores do que 50% não sendo possível calcular a CE₅₀ e conseqüentemente, os valores de IS (CC₅₀ / CE₅₀). Os valores representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

Considerando tais resultados, optou-se por dar seqüência aos estudos químicos e farmacológicos com esse composto, através da síntese de novos análogos e da elucidação do seu mecanismo de ação, já que o mesmo apresentou um mecanismo de ação diferente daquele do aciclovir e também o melhor índice de seletividade entre todos os compostos testados.

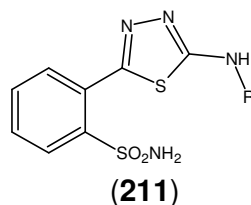
Com o intuito de verificar a influência de outros substituintes foi sintetizado o composto (**51**), no qual o núcleo 2-amino-5-metiltio-1,3,4-tiadiazol é um grupo doador de elétrons e produz um análogo mais hidrofílico do que o composto (**98**). Entretanto, o composto (**51**) apresentou uma fraca porcentagem de inibição da replicação do HSV-1 29R.



(**51**)

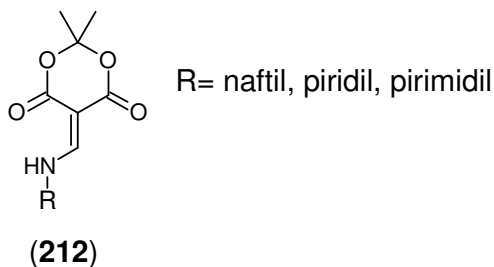
Bonina et al., (1982) demonstrou que o composto 2-amino-5-(2-sulfamóilfenil)-1,3,4-tiadiazol (**211**) apresentou atividade antiviral contra vírus de genoma DNA (HSV-1, HSV-2 e adenovírus) e contra vírus com genoma RNA (poliovírus tipo 1, equovírus 2, e coxsakievírus B4). A substituição do H da amina primária por CH₃ ou CH₂CH=CH₂ produziu perda da atividade contra os vírus com genoma de DNA, mas preservou a atividade inibitória sobre os vírus com genoma de RNA. A substituição por CH₂CH₃ não inibiu a replicação dos vírus com genoma de RNA e de DNA. Desta forma os autores sugeriram que a cadeia lateral é um dos pontos mais críticos

desses compostos.



Considerando-se que para os compostos **(92)**, **(93)**, **(94)**, **(95)** e **(96)** a mudança do núcleo 1,3,4-tiadiazol por outros núcleos estruturalmente relacionados, tais como triazol, tiazol, bromotiazol, tiazolino e metiltiazol, levaram a uma perda da atividade antiviral em relação ao HSV-1 cepa 29R, (Tabela 26) e que a presença de substituintes hidrofílicos ou lipofílicos no carbono 5 do núcleo 1,3,4-tiadiazol nos compostos **(51)** e **(97)**, respectivamente, também levaram a uma acentuada diminuição da atividade antiviral. Pode-se desta forma sugerir que o núcleo 1,3,4-tiadiazol é o grupo farmacofórico, ou seja, é a subunidade estrutural do composto **(98)** responsável pela inibição da replicação do vírus HSV-1 cepa 29R.

Os derivados 5-aminotileno do ácido de Meldrum são importantes intermediários para a síntese de diferentes compostos que apresentam atividade biológica (PENG et al., 2002; MADRID et al., 2005; LITVINOV et al., 2005), normalmente, não sendo avaliado quanto as suas propriedades biológicas durante este estágio de intermediário. Entretanto, verificou-se a existência de uma patente de 1966 (Patent 464850, 1966) que descreve que os derivados do ácido de Meldrum **(212)** inibiram a replicação do vírus vaccínia em camundongos. Esses compostos aumentaram o tempo de sobrevivência dos camundongos infectados com o vírus da vaccínia em comparação com os não tratados e levou uma cura de cerca de 80% dos animais testados.



5.2.2.3 Estudo do mecanismo de ação antiviral do composto (98)

A elucidação do mecanismo de ação antiviral do composto (98) foi iniciada no Brasil e uma outra etapa foi realizada no Departamento de Virologia Clínica da Universidade de Göteborg, Suécia (Göteborg University), sob a co-orientação do Prof. Dr. Tomas Bergström. Antes de dar continuidade aos estudos de elucidação do mecanismo de ação do composto (98), este foi testado em relação ao sua ação antiviral contra o vírus HSV-2, vírus responsável pelas infecções herpéticas genitais, o qual pode causar doenças severas em recém-nascidos e em pacientes imunodeprimidos (COSTELLO et al., 2006) e contra o vírus sincicial respiratório (RSV), o qual pode causar doenças no trato respiratório baixo infantil, em pacientes imunodeprimidos e em idosos (FLASEY; WALSH, 2000).

O composto (98) apresentou um baixa porcentagem de inibição da replicação do vírus HSV-2, 37% na maior concentração testada (250 μ M) e uma baixa atividade anti-RSV apresentando um valor de $IS > 6$ ($CC_{50} > 1000 \mu$ M e $CE_{50} = 154,9 \pm 6,5 \mu$ M).

Experimentos baseados na co-incubação de 4×10^4 PFU do HSV-1 29R/aciclovir resistente, do HSV-2 cepa 333 e do RSV cepa A2 com diferentes concentrações do composto (98) (250,0 – 15,6 μ M, razão de 1:2) por 15 min a 37°C, seguida pela diluição da mistura a uma concentração não inibitória do composto revelou que o mesmo não causou a inativação da infecciosidade do HSV-1, do HSV-2 e do RSV nas concentrações testadas. Portanto, o composto (98) não apresentou ação virucida sobre os vírus testados.

Considerando tais resultados, deu-se continuidade ao estudo do mecanismo de ação antiviral do composto (98) somente em relação ao vírus HSV-1 29R.

Inicialmente, para que fosse possível avaliar em qual fase do ciclo de replicação viral o composto (98) estaria atuando, foi determinado o efeito do tempo de adição desse composto sobre o ciclo de replicação do HSV-1 cepa 29R, segundo metodologia descrita no item 4.2.11.1. Os resultados estão apresentados na Figura 8.

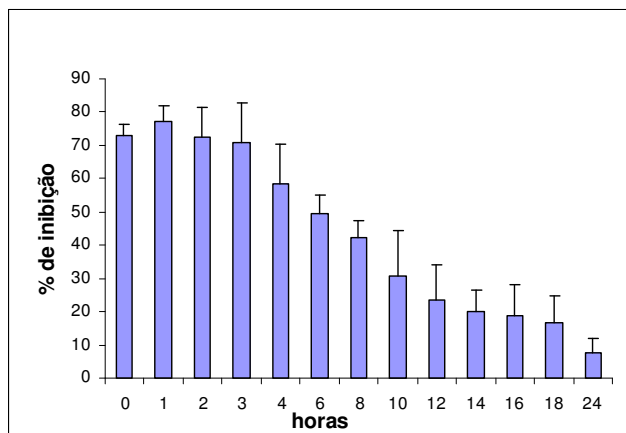


Figura 8: Efeito do tempo de adição do composto (**98**) ($125 \mu\text{M}$) sobre o ciclo de replicação do HSV-1 cepa 29R. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

A replicação do DNA do HSV é semiconservativa e sua taxa máxima ocorre entre 4 e 7 h pós-infecção (PI) (COLBÈRE, 1975). Durante a infecção produtiva, mais do que 84 diferentes proteínas são expressas de uma forma coordenada e regulada em três fases:

- Na fase imediata (α) são expressas as proteínas que regulam a replicação viral e que são sintetizadas em torno de 3 a 4 h pós-infecção. Exemplo das proteínas α : proteínas ICP4, ICP27 e ICP47.
- Na fase precoce (β) são expressas as proteínas que promovem a replicação do DNA viral e a expressão das proteínas δ , o que ocorre entre 5 a 7 h pós-infecção. Exemplo das proteínas β : timidina quinase e DNA polimerase viral.
- Na fase tardia (δ) são expressas as proteínas estruturais do capsídeo e outras proteínas que formarão o vírion, e que são sintetizadas até 12 h pós-infecção. Exemplo das proteínas δ : glicoproteínas gC, gD e gE.

Das 84 proteínas conhecidas, pelo menos 47 não são necessárias para a replicação viral em cultura de células (COLBÈRE, 1975).

O composto (**98**) ($125 \mu\text{M}$) inibiu a replicação do vírus HSV-1 cepa 29R quando ele foi adicionado nas primeiras 3 h pós-infecção (Figura 8) e isto pode sugerir que o mesmo interfere com os eventos imediatos (proteínas alfa) da replicação do HSV-1. O pré-tratamento das células com o composto **98** por 3h antes da infecção não afetou a multiplicação do vírus, portanto, este compostos não

possuem efeito profilático *in vitro* contra a infecção por HSV-1.

Na sequência foi analisado se a inibição da replicação do HSV-1 cepa 29R pelo composto (**98**) estava relacionado com o bloqueio da síntese das proteínas virais nas células VERO. A expressão das proteínas virais ICP-27 e gD em células VERO foi analisada por *Western Blotting*. Enquanto as células não infectadas não expressaram estas proteínas, todas elas foram detectadas nas células infectadas com HSV-1 e não tratadas com o composto. O tratamento com 125 μ M do composto (**98**), por 16h após infecção, suprimiu quase totalmente a expressão da proteína α , ICP-27 e apresentou pequena supressão da expressão da proteína γ , gD (Figura 9).

ICP27 (63 kDa)

1 2 3



gD (61 kDa)

1 2 3



Figura 9: Efeito do composto (**98**) (125 μ M) sobre a expressão das proteínas ICP-27 e gD do HSV-1 cepa 29R em células VERO, detectado por *Western Blotting*. Linha 1: células VERO não infectadas; linha 2: células VERO infectadas com HSV-1 29R; linha 3: células VERO infectadas com HSV-1 29R e tratadas com 125 μ M do composto.

A ICP27 é uma proteína regulatória multifuncional que é essencial para a replicação do HSV-1. Esta fosfoproteína de 63 kDa é expressa durante a fase imediata, é requerida para a expressão apropriada dos genes virais da fase precoce e tardia (DAI-JU et al. 2006) e bloqueia o processamento do mRNA, o que acarreta uma diminuição da produção de proteínas celulares (SMITH et al. 2005). A ICP27 é a

responsável pelo bloqueio da síntese de proteínas da célula hospedeira. Também foi demonstrado que a ICP27 atua pós-transcricionalmente no processamento e na exportação do RNA (SCIABICA et al., 2003) e evidências recentes sugerem sua participação no início da translação (ELLISON et al., 2005). Além disso, a ICP27 parece contribuir com a regulação transcricional dos genes precoces e tardio (JEAN et al., 2001). Assim, a ICP27 parece atuar em todos os estágios da expressão dos genes virais, desde a transcrição até a tradução (DAI-JU et al. 2006), podendo ser considerada um alvo importante para os novos fármacos antivirais.

Assim, esses resultados sugerem que o composto (98) inibe a replicação do HSV-1 cepa 29R, em parte, através do bloqueio da síntese da proteína α ICP27, confirmando que este composto interfere com os eventos imediatos da replicação deste vírus.

A expressão de genes imediatos representa um estágio do ciclo de replicação do HSV-1 que poderia ser utilizado como um novo alvo para a terapia antiviral levando a uma significativa redução da replicação tanto nas infecções agudas como latentes. A expressão dos genes imediatos não apresenta somente um papel indispensável na regulação da expressão de todas as classes de genes virais durante a infecção lítica, mas também parece ser o evento chave inicial no processo de reativação de infecções latentes. Assim, pequenas moléculas que agem como inibidores da expressão dos genes imediatos podem representar uma alternativa potencial para o desenvolvimento de novas terapias com um espectro de ação mais amplo do que os análogos de nucleosídeos (BOULWARE et al., 2001; WEBER, 2002).

O efeito do composto (98) sobre a expressão de outras proteínas virais γ como a gB, gC e gE nas células GMK AH1 também foi investigado através de um ensaio tipo ELISA. O composto (98) não inibiu a expressão da gC e apresentou baixas porcentagens de inibição das glicoproteínas gB e gE, 20,47% e 29,52%, respectivamente, na maior concentração testada (250 μ M). Estes valores de inibição não são expressivos, assim como a pequena supressão da expressão da proteína γ , gD quando analisado por *Western Blotting* (Figura 9), sugerindo que o efeito deste composto sobre a expressão das proteínas γ representa uma pequena ou nenhuma participação na atividade antiviral detectada.

Posteriormente, foi avaliado se o composto (98) apresenta qualquer efeito

sobre a replicação do DNA do HSV-1 cepa 29R, um dos principais eventos durante o complexo programa de transcrição viral. Assim, usando a PCR quantitativa em tempo real com sonda *TaqMan*®, através da amplificação de um segmento da glicoproteína gB, foi determinado o número de cópias do DNA do HSV-1 em células infectadas tratadas e não tratadas com diferentes concentrações do composto (98).

As amostras biológicas são complexas e podem conter substâncias inibidoras que não estão presente nos padrões baseados em plasmídeos recombinantes, e isto pode reduzir a eficiência da PCR. Assim, o uso das amostras extraídas e diluídas permite contornar a possível presença dos inibidores da PCR (KUBISTA et al., 2006).

Se há amostra suficiente ela pode ser purificada extensivamente e então diluída, o que reduz a inibição. Mas alguns inibidores são difíceis de remover por diluição. Nesses casos, pode-se estimar a eficiência da PCR pela diluição em série da amostra ou pelo método de adição de padrão (NAMVAR et al., 2005; KUBISTA et al., 2006).

Neste trabalho o DNA foi extraído utilizando o sistema MagNA Pure LC robot e as amostras, obtidas após extração, foram diluídas (1:10) antes de serem utilizadas na PCR em tempo real.

Através da PCR em tempo real verificou-se que o composto (98) não inibiu a síntese do DNA viral nas concentrações testadas, sugerindo que o mecanismo da ação antiviral desse composto não está relacionado com a inibição da síntese de DNA do HSV-1 cepa 29R.

O efeito do composto (98) sobre a dispersão do HSV-1 cepa 29R célula a célula foi investigado pela adição do composto às células após sua infecção com o HSV e deixando sobre a monocamada durante todo o período de desenvolvimento das placas virais. Para assegurar que a dispersão dos vírus ocorresse somente pela transmissão célula a célula, o meio foi suplementado com metilcelulose. Os resultados foram expressos como uma redução na área das placas virais formadas.

O composto (98) reduziu substancialmente a área das placas de lise formadas pelo HSV-1 cepa 29R (Figura 10) apresentando um valor de IS_{24} ($CC_{50} > 1000 \mu M$ e $CE_{50} = 41,2 \pm 3,3 \mu M$), através do Método de redução do tamanho das placas de lise. As médias das áreas das placas virais foram de $0,168 \pm 0,094 \text{ mm}^2$ para o controle viral e de $0,065 \pm 0,054 \text{ mm}^2$ para o composto (98) na concentração de $125 \mu M$, sugerindo que este composto tem um potencial de

interferir com a atividade de dispersão do HSV célula a célula.

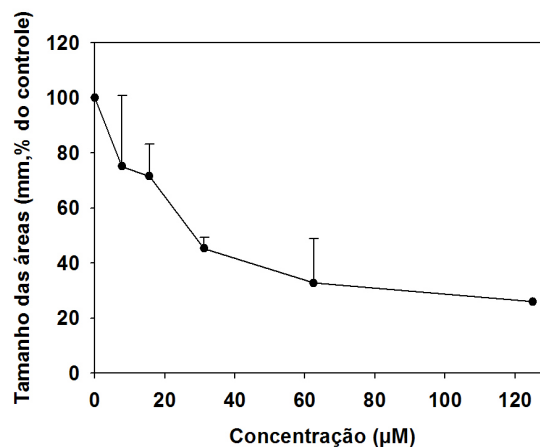


Figura 10: Efeito do composto (**98**) sobre a dispersão célula a célula do vírus HSV-1 cepa 29R, avaliado através do método de redução do tamanho das placas de lise. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes com duas réplicas cada.

Estes experimentos em células cultivadas revelam que a inibição da dispersão do HSV-1 cepa 29R pode ser um dos alvos do composto (**98**) que contribui para a sua atividade antiviral.

O HSV infecta as células do epitélio estratificado escamoso que forma a epiderme e a mucosa em diferentes sítios anatômicos incluindo as regiões oral e genital. Uma rápida dispersão dos vírus célula a célula é de vital importância para estabelecer infecções primárias ou recorrentes produtivas no homem (NYBERG et al., 2004) e, portanto, um alvo atrativo para a intervenção antiviral. Assim, o potencial para reduzir a dispersão dos vírus célula-célula pode encontrar aplicação no desenvolvimento de fármacos para o tratamento das lesões do HSV (BERGEFALL, 2005).

Portanto, pode-se sugerir que o mecanismo de atividade antiviral do composto (**98**) parece ser mediado, pelo menos em parte, pela inibição da dispersão do HSV-1 cepa 29R célula a célula e pela interferência com os eventos imediatos da replicação deste vírus, através do bloqueio da síntese da proteína α ICP27.

5.2.3 Triagem da potencial atividade antiviral realizada no Departamento de Virologia Clínica da Universidade de Göteborg/Suécia.

5.2.3.1 Sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona e sulfonamidas derivadas da sulfonamida

Os resultados da potencial atividade anti-HSV-2 e anti-RSV das sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona e das sulfonamidas derivadas da quinolina estão descritos na Tabela 31. As sulfonamidas derivadas da quinolina apresentaram baixas porcentagens de inibição da replicação do vírus RSV cepa A2, enquanto que, as sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona foram citotóxicas para as células HEp-2 nas concentrações de 100, 50 e 25 μ M.

Os compostos que apresentaram 100% de inibição da replicação do HSV-2, na concentração de 100 μ M, foram submetidos a avaliação da citotoxicidade (ensaio do MTS) e da confirmação da atividade antiviral (método de redução de formação de placas de lise), utilizando a diluição seriada de cada composto (razão 1:2), a fim de determinar os valores de CC₅₀ e a CE₅₀, respectivamente (Tabela 32).

Os estudos da atividade antiviral das sulfonamidas derivadas de chalcona e das sulfonamidas derivadas de quinolina não foram explorados, pois as baixas porcentagens de inibição da replicação viral e os baixos índices de seletividade verificados (Tabela 32), não são consideradas promissores na pesquisa de novos fármacos antivirais.

As sulfonamidas derivadas de chalcona e as sulfonamidas derivadas de quinolina foram submetidas a uma avaliação da atividade anti-HIV no Departamento de Virologia Clínica da Universidade de Göteborg/Suécia, pela aluna de Doutorado, Joanna Said. Somente o composto (**39**) (100 μ M) inibiu a formação dos sincícios, que é o efeito citopático viral do HIV, após 6 e 13 dias de infecção das células H-9 pelo vírus HIV-1. Entretanto, o composto (**39**) não inibiu consideravelmente a expressão da proteína p24, que foi avaliado através de um ensaio do tipo ELISA *in house*. A proteína p24 é tida como um bom indicador da infecção pelo HIV e sua existência pode ser traduzida como replicação viral ativa (ALLAIN et al, 1986).

Tabela 31: Resultados da triagem da potencial atividade antiviral das sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona **22** a **30** (100 μ M) e das sulfonamidas derivadas da quinolina **38** a **48** (100 μ M), através do método de redução de formação de placas de lise.

Compostos	% de Inibição	
	HSV-2 333	RSV A2
22	SI	CT
23	SI	CT
24	SI	CT
25	100	CT
26	SI	CT
27	SI	CT
28	100	CT
29	100	CT
30	15,2	CT
38	SI	SI
39	100	27,3
40	100	35,3
41	10,5	12,1
42	100	18,8
43	13,2	16,5
44	12,0	6,5
45	SI	20,6
46	NT	NT
47	28,2	24,4
48	11,9	13,2

SI = sem inibição; CT = citotóxico; NT = não testado. Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

O sulfonato derivado da 8-hidroxi-quinolina (**50**) e o aduto do ácido de Meldrum (**210**) apresentaram 55,2% de inibição da replicação do HSV-2 cepa 333 e 21,6% de inibição da replicação do RSV, respectivamente, não sendo considerados promissores na pesquisa de novos fármacos antivirais. Os compostos (**49**) e (**209**) não inibiram a replicação do HSV-2 e do RSV.

Tabela 32: Resultados da citotoxicidade e da atividade anti-HSV-2 das sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona e das sulfonamidas derivadas da quinolina, através do ensaio do MTS e do método de redução de formação de placa de lise, respectivamente .

Compostos	CC ₅₀ (μM)	CE ₅₀ (μM)	IS
25	100,9 ± 16,8	32,1 ± 7,9	3
28	165,6 ± 66,2	67,5 ± 6	2
29	107,9 ± 29,0	42,3 ± 10,9	3
39	262,3 ± 30,2	56,3 ± 11,4	5
40	139,5 ± 23,1	39,3 ± 11,8	4
42	187,9 ± 3,4	60,1 ± 4,5	3

Os valores representam a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes com duas réplicas cada. IS = Índice de seletividade.

5.2.3.2 Oligossacarídeos e Polissacarídeos sulfatados

Ao contrário dos extensos estudos relatados sobre a atividade anti-HSV dos oligo/polissacarídeos (VAHERI, 1964, BABA et al., 1988; WITVROUW; DE CLERCQ, 1997; CARLUCCI et al., 2002; PONCE et al., 2003; ZHU et al., 2006; ADAMIAK et al., 2007) tem sido menos investigado o efeito desses compostos sobre a infecciosidade do RSV. Alguns trabalhos têm descrito que certos oligo/polissacarídeos tais como heparina, dextrana, manana ou galactanas sulfatadas, polisulfato de pentosana e β-glucanas sulfatadas interferem na infecção das células pelo RSV (WITVROUW; DE CLERQ, 1997; ZHANG et al., 2004).

Assim, um grupo de 55 diferentes oligossacarídeos e polissacarídeos sulfatados e seus derivados foram avaliados em uma única concentração de 100 μg/mL em relação a sua potencial atividade contra os vírus RSV, HSV-1 e o HSV-2 (Tabelas 33, 34, 35 e 36). Foram incluídos nestes grupos de compostos, unidades de dissacarídeos sulfatados de diferentes açúcares, seus derivados oligoméricos (acima de heptassacarídeo), derivados de lactose sulfatados, assim como vários polissacarídeos sulfatados e compostos polisulfonados.

Tabela 33: Resultados da triagem da potencial atividade antiviral dos oligossacarídeos e polissacarídeos sulfatados (100 µg/mL), através do método de redução de formação de placa de lise.

Compostos	% de Inibição		
	RSV A2	HSV-1 KOS 321	HSV-2 333
145	11,1	18,9	6,3
146	8,5	48,6	0,6
147	6,2	24,3	5,4
148	14,0	0,0	0,0
149	5,4	12,2	1,9
150	8,3	20,3	26,6
151	7,4	33,8	24,1
152	7,7	14,9	0,0
153	16,5	45,9	37,0
154	29,1	94,6	80,4
155	23,3	90,3	78,2
156	4,9	31,9	5,8
157	8,2	36,1	4,1
158	76,4	98,6	73,9
159	14,9	18,1	35,5
160	38,4	84,7	64,3
161	74,3	84,7	72,3
162	56,6	87,5	67,2
163	40,4	12,5	23,8
164	28,1	90,3	52,8
165	54,1	85,3	86,5
166	77,3	78,7	71,5
167	76,8	96,0	81,1
168	59,8	62,7	81,7
169	0,0	0,0	74,6

Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

Tabela 34: Resultados da triagem da potencial atividade antiviral dos oligossacarídeos e polissacarídeos sulfatados (100 µg/mL), através do método de redução de formação de placa de lise.

Compostos	% de Inibição		
	RSV A2	HSV-1 KOS 321	HSV-2 333
170	71,6	45,3	68,0
171	44,5	89,3	79,6
172	70,7	84,0	81,3
173	67,2	92,0	84,4
174	67,0	100,0	100,0
175	87,9	93,0	66,5
176	83,0	93,5	72,6
177	100,0	100,0	100,0
178	94,3	88,9	95,0
179	84,8	96,0	98,8

Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

Tabela 35: Resultados da triagem da potencial atividade antiviral dos derivados de lactose sulfatados (100 µg/mL), através do método de redução de formação de placa de lise.

Compostos	% de Inibição		
	RSV A2	HSV-1 KOS 321	HSV-2 333
180	1,4	0,0	28,3
181	6,0	7,1	25,3
182	19,5	0,0	14,7
183	77,8	100,0	63,0
184	47,9	92,9	51,4
185	72,5	91,4	72,6
186	72,8	95,7	55,5
187	69,9	84,3	64,4
188	44,1	95,7	55,1
189	37,1	91,4	60,3

Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

Tabela 36: Resultados da triagem da potencial atividade antiviral dos derivados de lactose sulfatados (100 µg/mL), através do método de redução de formação de placa de lise.

Compostos	% de Inibição		
	RSV A2	HSV-1 KOS 321	HSV-2 333
190	4,1	67,1	49,3
191	15,1	84,3	50,7
192	22,0	61,4	44,6
193	33,6	82,5	48,3
194	0,0	0,0	0,0
195	0,0	52,6	59,1
196	37,2	5,3	39,8
197	0,0	0,0	13,1

Os valores representam a média de dois experimentos independentes.

Os oligossacarídeos sulfatados, como a sacarose (**145**), erlose (**146**), panose (**147**), rafinose (**148**), estaquiose (**149**), maltose (**150**), maltitol (**156**) ou isomaltose (**159**) exibiram pequena ou nenhuma atividade anti-RSV ou anti-HSV. Ao contrário, os dissacarídeos sulfatados celobiose (**165**) e laminbiose (**168**) inibiram moderadamente a infecção do RSV e do HSV em células susceptíveis. Alguns derivados oligoméricos da maltose (compostos **153**, **154**, **155**, **156** e **158**) isomaltose (compostos **160**, **161**, **162** e **164**), celobiose (compostos **166** e **167**) e laminbiose (**168**) foram mais potentes do que os compostos originais, apresentando uma maior inibição da infecção do RSV e/ou HSV em células susceptíveis. Uma potente atividade anti-RSV e anti-HSV também foi exibida por alguns derivados sulfatados da lactose (por exemplo, os compostos **183**, **184**, **185**, **186**, **187** e **188**). Os resultados da triagem confirmaram uma boa atividade anti-HSV para vários oligo/polissacarídeos sulfatados já descritos como compostos antivirais, tal como heparina (compostos **175** e **176**) (NAHIMAS; KIBRICK, 1964) e carragenana, (compostos **177**, **178** e **179**) (ZACHAROPOULOS; PHILLIPS, 1997) ou o composto polisulfonado, suramina **174** (AGUILAR et al., 1999) (Tabela 34).

Na atividade antiviral dos oligo/polissacarídeos é conhecida a correlação positiva entre o grau de oligomerização e sulfatação da cadeia de carboidratos (WITVROUW; DE CLERQ, 1997). Dessa maneira, os estudos de atividade antivirais

revelaram que exceto para celobiose e laminbiose, as unidades de dissacarídeos de outros açúcares não exibiram atividade anti-RSV ou anti-HSV. Entretanto, na maioria dos casos, uma atividade antiviral foi associada com os tetraoligossacarídeos ou com os oligossacarídeos maiores.

Baseados nos resultados da triagem, dois grupos de compostos sulfatados, isto é, os derivados do oligossacarídeo celobiose e os derivados de lactose foram selecionados para investigações posteriores. As atividades anti-RSV e anti-HSV desses compostos, expressas como as concentrações que inibem 50% a formação das placas virais (CE_{50}), são mostradas na Tabela 37.

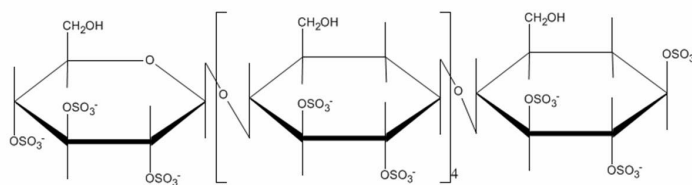
Tabela 37: Resultados da citotoxicidade e da atividade antiviral dos derivados de lactose sulfatados e dos derivados do oligossacarídeo celobiose, através do ensaio do MTS e do método de redução de formação de placa de lise, respectivamente.

Compostos	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	RSV A2		HSV-1 KOS 321		HSV-2 333	
		CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IS	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IS	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IS
165	>400	$68,6 \pm 11,9$	6	$57,6 \pm 2,2$	7	$24,3 \pm 3,4$	16
166	>400	$69,8 \pm 7,2$	6	$58,8 \pm 4,3$	7	$56,7 \pm 1,9$	7
167	>400	$17,8 \pm 2,9$	22	$2,9 \pm 0,8$	137	$2,2 \pm 0,3$	181
183	>400	$12,7 \pm 4,2$	31	$8,2 \pm 0,9$	49	$16,3 \pm 2,4$	24
184	>400	$48,6 \pm 6,8$	4	$14,7 \pm 2,0$	27	$17,4 \pm 5,5$	10
185	>400	$19,8 \pm 3,5$	20	$54,3 \pm 11,5$	7	$64,4 \pm 13,0$	6
186	>400	$75,6 \pm 13,7$	5	$52,1 \pm 1,3$	8	$67,9 \pm 4,4$	6
187	>400	$82,4 \pm 13,7$	5	$55,4 \pm 12,7$	7	$53,9 \pm 0,6$	7
188	>400	$82,3 \pm 12,2$	5	$58,8 \pm 5,4$	5	$61,1 \pm 1,9$	6

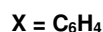
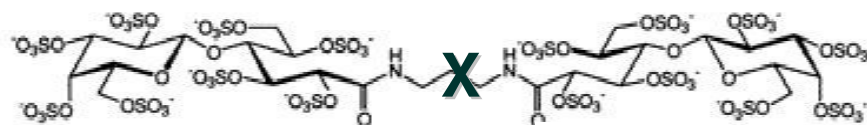
Os valores representam a média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes com duas réplicas cada. IS = Índice de seletividade.

A celohexaose sulfatada (**167**), um oligossacarídeo que compreende três unidades de celobiose, e o derivado da lactose sulfatado (**183**), que é composto por duas unidades do dissacarídeo lactose sulfatado ligadas por um espaçador hidrofóbico específico (C_6H_4), (Tabela 37) apresentaram os resultados mais promissores e não foram citotóxicos para as células HEp-2 e GMK AH1 na maior concentração testada (400 $\mu\text{g/mL}$). Assim, esses dois compostos foram

selecionados para uma avaliação mais detalhada da suas atividades anti-RSV e anti-HSV.



(167)



(183)

Os resultados do efeito dos compostos (167) e (183) sobre a infecciosidade viral são mostrados na Figura 11. A celohexaose (167) parece ser substancialmente menos ativa contra o RSV do que contra o HSV-1 e HSV-2. Tendência similar foi relatada para preparações de β -glucano sulfatados (ZHANG et al., 2004). Entretanto, o outro oligossacarídeo testado neste estudo, composto (183), derivado da lactose sulfatada, apresentou efeitos comparáveis sobre a infecciosidade do RSV e do HSV. Estes resultados sugerem que as diferentes características estruturais dos oligossacarídeos sulfatados tais como, os açúcares da cadeia principal, os grupos específicos usados como espaçadores e/ou a presença de porções hidrofóbicas, podem ser requeridas para inibir a infecção das células por estes dois vírus. Além disso, foi verificado que as glicosaminoglicanas contendo ácido idurônico (HALLAK et al., 2000a) e grupos *N*-sulfato das cadeias da glicosaminoglicana sulfato de heparana (HALLAK et al., 2000b) são necessárias para uma eficiente infecção pelo RSV, enquanto no caso do HSV os grupamentos específicas 2-*O*-sulfato e 6-*O*-sulfato das cadeias do sulfato de heparana foram essenciais para ligação destes vírus às células (FEYZI et al., 1997).

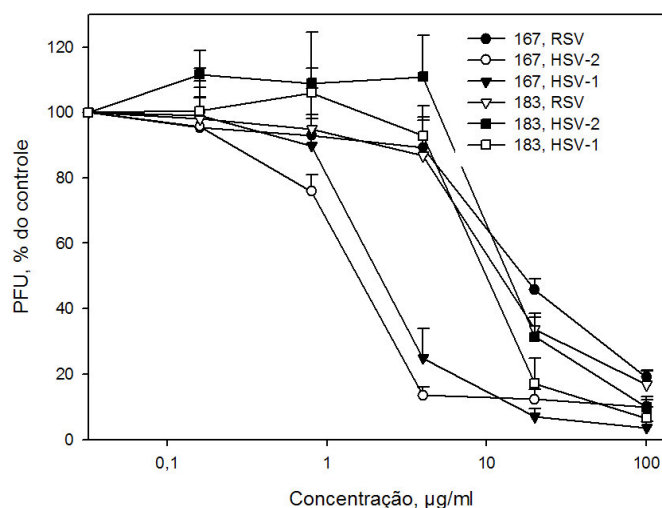


Figura 11: Efeito dos compostos (167) e (183) sobre a infecciosidade do HSV e do RSV, avaliados através do método de redução de formação das placas de lise. Cada ponto representa a média de dois experimentos independentes com duas réplicas cada.

Ambos compostos reduziram substancialmente o tamanho das placas formadas pelo HSV-1 e HSV-2 (Figura 12), sugerindo que estes compostos têm um potencial de interferir com a atividade de dispersão lateral do HSV em célula cultivadas. Devido às variações naturais do tamanho das placas do RSV, o efeito do (167) e do (183) sobre a atividade de dispersão deste vírus foi testado através do ensaio de centro infeccioso (item 4.2.11.4 letra B). Este ensaio reflete a habilidade de dispersão dos vírus a partir de células infectadas exogeneamente para outras células não infectadas. Os compostos (167) e (183) (ambos a 100 µg/mL) inibiram 34% e 43% a transmissão do RSV célula a célula, respectivamente.

O efeito dos polissacarídeos sulfatados sobre a dispersão célula a célula dos vírus foi previamente descrito (CHESHENKO et al. 2004; NYBERG et al., 2004; KAROLI et al., 2005). Esta atividade antiviral exige um composto relativamente pequeno que poderia penetrar no interior dos estreitos espaços intracelulares, portanto, o tamanho das moléculas pode ser um fator limitante (EKBLAD, 2007).

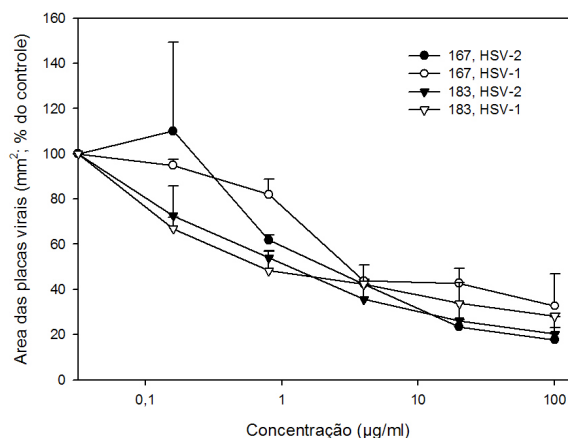


Figura 12: Efeito dos compostos (**167**) e (**183**) sobre a dispersão célula a célula do HSV, avaliado através do método de redução do tamanho das placas de lise. Cada ponto representa a média de dois experimentos independentes com duas réplicas cada.

Os compostos (**167**) e (**183**) reduziram a atividade de dispersão célula a célula do vírus HSV e em alguma extensão do RSV. Esta atividade pode ser atribuída ao relativo baixo peso molecular destes compostos que permite seu acesso aos estreitos espaços intracelulares. Cadeias muito maiores de polissacarídeos sulfatados, tal como, condroitin sulfato E, não inibiram a dispersão lateral do HSV em células cultivadas, apesar da potente inibição da infecção do HSV às células susceptíveis (NYBERG et al., 2004).

O relativo baixo peso molecular destes compostos em comparação com os polissacarídeos sulfatados convencionais é uma característica importante para aumentar a penetração dos oligossacarídeos dentro dos tecidos sólidos (BETZ et al., 2001) e a reduzir a atividade de dispersão célula a célula do HSV (NYBERG et al., 2004).

Os compostos (**167**) e (**183**) não causaram inativação das partículas virais do RSV ou do HSV nas diferentes concentrações testadas (100 – 0,16 µg/mL, razão de 1:5). Portanto, esses compostos não apresentaram ação virucida sobre os vírus testados.

Os polissacarídeos sulfatados e outros compostos polisulfonados são conhecidos por inibir *in vitro* muitos vírus envelopados, principalmente interferindo com a adsorção dos vírus às células. O receptor de superfície celular sulfato de

heparana serve com um receptor inicial para a ligação do HSV às células (WUDUNN; SPEAR, 1989) e de muitos outros vírus (LIU; THORP, 2002). Assim, estes compostos são conhecidos por competir com as proteínas de adsorção viral pela ligação com cadeias de glicosaminoglicanas (GAG) de proteoglicanas da superfície celular, principalmente à GAG sulfato de heparana (WITVROUW; DE CLERCQ, 1997).

Desta forma, decidiu-se avaliar qual o efeito dos compostos **(167)** e **(183)** na ligação dos vírus RSV e HSV purificados e marcados radioativamente. Ambos os compostos reduziram a adsorção do RSV e do HSV às células (Figura 13).

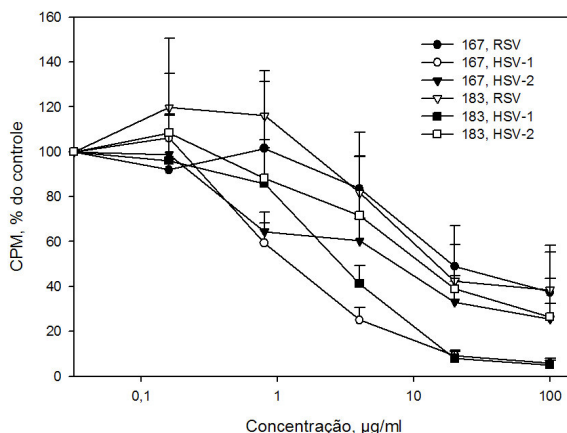


Figura 13: Efeito dos compostos **(167)** e **(183)** sobre a adsorção dos vírions purificados e marcados radioativamente do HSV e do RSV às células GMK AH1 e HEp-2, respectivamente. Cada ponto representa a média de dois experimentos independentes com duas réplicas cada.

Também foram testados os efeitos dos compostos **(167)** e **(183)** sobre a ligação das glicoproteínas de adsorção purificadas gB e gC do HSV-1 ou do HSV-2 às células GMK AH1 (Figura 14).

Neste resultado verificou-se uma diminuição da capacidade de ligação da gC e em alguma extensão da gB na presença dos compostos **(167)** e **(183)**, o que indica que esses compostos agem, como outros oligo/polissacarídeos sulfatados (WITVROUW; DE CLERCQ, 1997), pela interferência com a ligação do RSV/HSV às células (CARLUCCI et al., 1999; ZHU et al., 2006). Deve-se notar que a presença contínua do polissacarídeo sulfatado durante a infecção inicial dos vírus às células é necessária para o efeito inibitório (VAHERI, 1964) sugerindo que a interação do

inibidor com a partícula viral é reversível e não virucida (NEYTS; DE CLERCQ, 1995). Além disso, apesar da potente atividade antiviral dos compostos **(167)** e **(183)**, estes compostos não inativaram as partículas virais do RSV e HSV.

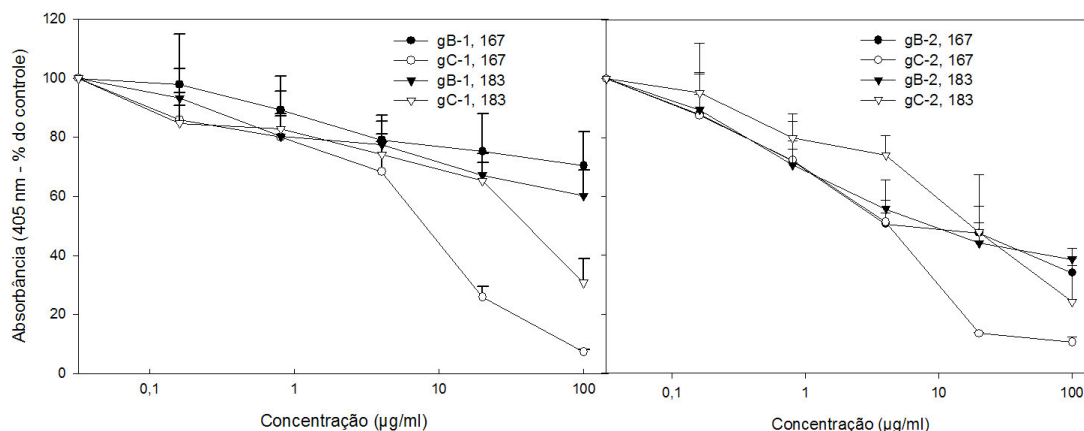


Figura 14: Efeito dos compostos **(167)** e **(183)** sobre a ligação das glicoproteínas gB e gC do HSV-1 e do HSV-2 às células GMK AH1. Cada ponto representa a média de dois experimentos independentes com duas réplicas cada.

As análises das variantes de vírus resistentes a um determinado composto podem ajudar no desenvolvimento de uma nova geração de compostos antivirais, com otimização da sua atividade antiviral, através elucidação em base moleculares dessa resistência viral. Posteriormente, a análise dessas variantes poderá aumentar o conhecimento sobre as atividades biológicas das proteínas virais envolvidas (EKBLAD, 2007).

Os polissacarídeos são conhecidos como pobres indutores de resistência viral (TRYBALA et al., 2002). Entretanto, foram previamente descritos o desenvolvimento de variantes do HSV-1 resistente aos polissacarídeos sulfatados da carragenana (CARLUCCI et al., 2002) ou heparina (PERTEL; SPEAR, 1996) pela propagação em cultura de células na presença destes agentes.

Na seqüência, procurou-se investigar se a pressão contínua dos compostos **(167)** e **183** sobre a dispersão célula a célula do vírus HSV poderia selecionar variantes dos vírus resistentes à estes compostos. Para isso diferentes cepas de HSV-1 e HSV-2 foram propagadas nas células GMK AH1 na presença destes compostos. Os compostos preparados em meio de cultura + 1% metilcelulose em solução de Hank estiveram presentes durante todo período de formação das placas virais.

A presença desses compostos durante a formação das placas virais não causou nenhuma seleção de mutantes resistentes aos compostos das cepas selvagens do HSV-1 e do HSV-2 e da cepa HSV-2 gC-negativa gCneg1 (Tabela 38 e 39). Entretanto, passagens únicas na presença dos compostos **(167)** e **(183)** das cepas HSV-1 KOS cepa gC-nula variante gC⁻39 ou HSV-1 MP, cepa gC-negativa e indutora da formação de sincícios, resultaram na seleção de placas virais relativamente grandes (Figura 15) e resistentes aos composto **(167)** (Tabela 38) ou **(183)** (Tabela 39).



Figura 15: Placas do HSV-1 KOS cepa gC nula variante gC⁻39 resistente (foco grande) e sensível (foco pequeno) ao composto **(183)**, coradas por imunocitoquímica.

As variantes (R1 a R8) foram separadas das cepas gC negativas do HSV-1 (gC⁻39 ou MP) baseado no seu distintivo tamanho na presença do inibidor. O ensaio de dispersão dos vírus célula-célula foi realizado para comparar a sensibilidade destas variantes resistentes aos compostos e suas cepas parentais. Os valores de CE₅₀ foram expressos como 50% da redução do tamanho das placas virais e verificou-se neste ensaio que as variantes foram substancialmente resistentes quando relacionadas as cepas parentais (Tabela 38 e 39).

O ensaio de infecciosidade foi realizado para comparar a sensibilidade destas variantes resistentes aos compostos e suas cepas parentais. Os valores de CE₅₀ foram expressos como 50% da redução do número das placas virais. Neste ensaio somente algumas variantes foram resistentes quando relacionado à cepa parental, como por exemplo, as cepas R1 e R2 (Tabela 40).

Tabela 38: Efeito do composto (**167**) sobre o tamanho das placas virais das cepas do HSV e das variantes do HSV-1 resistentes, nas células GMK AH1, através do método de redução do tamanho das placas virais.

Vírus	Média da área das placas virais (mm ² , n=20)		% em relação ao controle viral	^z CE ₅₀ (µg/mL)
	Composto (167) (100 µg/mL)	Controle viral		
HSV-1 KOS 321	49,5 ± 28,5	160,9 ± 65,3	30,8	9,9 ± 1,2
HSV-2 333	15,7 ± 9,1	85,9 ± 48,1	18,3	4,3 ± 0,8
HSV-2 gCneg1	22,8 ± 1,6	77,9 ± 7,9	29,3	NT
HSV-1 gC ⁻ 39	78,6 ± 32,1	199,3 ± 121,9	39,4	83,2 ± 9,3
HSV-1 MP	297,2 ± 265,3	772,4 ± 532,8	38,5	85,3 ± 7,9
HSV-1 gC ⁻ 39 R1	230,6 ± 88,7	274,9 ± 121,6	83,9	>100
HSV-1 gC ⁻ 39 R4	627,6 ± 403,7	802,5 ± 628,1	78,2	>100
HSV-1 MP R2	1232,5 ± 508,4	1294,5 ± 872,6	95,2	>100
HSV-1 MP R3	777,2 ± 391,9	1073,5 ± 553,3	72,4	>100

^zCE₅₀ = concentração que reduz 50% o tamanho das placas virais. NT= não testado. Os valores representam a média de dois experimentos independentes com duas réplicas cada.

Tabela 39: Efeito do composto (**183**) sobre o tamanho das placas virais das cepas do HSV e das variantes do HSV-1 resistentes, nas células GMK AH1, através do método de redução do tamanho das placas virais.

Vírus	Média da área das placas (mm ² , n=20)		% em relação ao controle viral	^z CE ₅₀ (µg/mL)
	Composto (183) (100 µg/mL)	Controle viral		
HSV-1 KOS 321	35,1 ± 18,6	129,4 ± 57,2	27,1	1,37 ± 0,1
HSV-2 333	74,2 ± 48,8	174,0 ± 8,8	18,9	1,46 ± 0,2
HSV-2 gCneg1	32,9 ± 1,6	176,9 ± 7,9	19,3	NT
HSV-1 gC ⁻ 39	34,2 ± 63,0	171,0 ± 129,7	20,0	5,60 ± 1,7
HSV-1 MP	333,8 ± 155,6	791,1 ± 431,0	42,2	49,1 ± 3,9
HSV-1 gC ⁻ 39 R6	419,3 ± 206,2	488,1 ± 294,3	85,9	>100
HSV-1 gC-39 R8	133,6 ± 103,3	223,2 ± 222,1	59,8	>100
HSV-1 MP R5	1241,7 ± 511,6	1293,8 ± 767,0	95,9	>100
HSV-1 MP R7	1122,2 ± 369,4	1401,5 ± 729,0	80,1	>100

^zCE₅₀ = concentração que reduz 50% o tamanho das placas virais. Os valores representam a média de dois experimentos independentes com duas réplicas cada.

Tabela 40: Efeito dos compostos (**167**) e (**183**) sobre a infecciosidade das cepas do HSV-1 gC negativas parentais e das variantes do HSV-1 gC negativas resistentes aos compostos (**167**) e (**183**), nas células GMK AH1, através do método de redução da formação das placas virais

Vírus	Composto (167) ^a CE ₅₀ (µg/mL)	Vírus	Composto (183) ^a CE ₅₀ (µg/mL)
HSV-1 gC ⁻ 39	7,6 ± 1,2	HSV-1 gC ⁻ 39	3,3 ± 0,4
HSV-1 gC ⁻ 39 R1	74,1 ± 3,5	HSV-1 gC ⁻ 39 R6	9,2 ± 0,4
HSV-1 C ⁻ 39 R4	11,6 ± 3,4	HSV-1 gC-39 R8	7,8 ± 1,6
HSV-1 MP	11,9 ± 1,7	HSV-1 MP	11,8 ± 0,1
HSV-1 MP R2	66,8 ± 8,5	HSV-1 MP R5	15,2 ± 2,2
HSV-1 MP R3	11,5 ± 1,03	HSV-1 MP R7	23,9 ± 3,1

^aCE₅₀ = concentração que reduz 50% a formação das placas virais. Os valores representam a média de dois experimentos independentes com duas réplicas cada.

Muitas destas variantes do HSV-1 foram mais resistentes quando na presença do inibidor durante a dispersão dos vírus célula a célula (Tabelas 38 e 39) do que na presença do inibidor durante a infecção inicial das células (Tabela 40). É provável que na ausência da glicoproteína gC, a principal proteína de adsorção, os vírus sejam menos estáveis e algumas alterações adaptativas podem aparecer em outras proteínas virais (BERGEFALL, 2005). Assim, as variantes com essas potenciais alterações são susceptíveis de serem selecionadas quando na presença dos oligossacarídeos sulfatado

A presença de variantes resistentes aos compostos (**167**) e (**183**) nas cepas gC-negativas do HSV-1 sugere que, com exceção da gC, outro (s) componente (s) virai (s) poderiam ser alvo destes compostos durante o curso da infecção viral das células, pois a interação do HSV com as cadeias do sulfato de heparana é um processo complexo que envolve diferentes glicoproteínas do envelope viral.

As glicoproteínas do envelope gC, gB e gD do HSV são descritas por interagir com as cadeias do receptor de superfície celular sulfato de heparana e esses componentes, portanto, são provavelmente os alvos para os polissacarídeos sulfatados inibidores. Entretanto, os dois tipos de HSV diferem em suas interações com o receptor de superfície celular sulfato de heparana, com respeito as glicoproteínas e as partes do receptor sulfato de heparana envolvidos.

A glicoproteína gB, designada gB1 e gB2 para o HSV-1 e HSV-2,

respectivamente, é requerida para a entrada dos vírus na célula, um evento que conta com a fusão entre os lipídeos do envelope do vírion e a membrana plasmática celular. A gB1 liga-se ao receptor de superfície celular sulfato de heparana mediando assim, a adsorção do vírus as células na ausência da gC1. Entretanto, esta proteína não é essencial para adsorção dos vírus na presença da glicoproteínas gC1 (HEROLD et al. 1994). Estudos demonstraram que a gB2 é a principal proteína de adsorção para o HSV-2 e é requerida para a entrada e para a dispersão célula a célula (HEROLD et al., 1996; CHESHENKO;HEROLD, 2002).

A glicoproteína gC1 é a principal proteína de adsorção do HSV-1 que media a ligação dos vírus ao receptor de superfície celular sulfato de heparana (TRYBALA et al., 1993) ou ao sulfato de condroitina (MARDBERG et al., 2002). Embora, a glicoproteína gC2 também se liga ao receptor de superfície celular sulfato de heparana esta proteína não é considerada essencial para a adsorção do HSV-2 (TRYBALA et al., 2000). Além da gB e da gC, a glicoproteína D do HSV-1 e não sua homóloga do HSV-2 pode ligar-se as cadeias do sulfato de heparana do receptor de superfície celular modificadas por várias isoformas de 3-O-sulfotransferases, uma interação que tem como alvo a entrada do HSV-1 nas células (SHUKLA et al., 1999). Embora o vírus possa usar dois outros receptores celulares alternativos o HVEM (mediador de entrada de herpesvírus) e as nectinas 1 e 2 para realizar esta tarefa (SHUKLA; SPEAR, 2001).

Portanto, o mecanismo de atividade antiviral dos compostos oligossacarídeos sulfatados (**167**) e (**183**) parece ser mediado pela inibição da dispersão célula a célula do HSV e em alguma extensão do RSV, pela interferência na ligação dos vírus RSV/HSV às células susceptíveis e vale a pena ressaltar que outro (s) componente viral, além da glicoproteína gC, pode ser o alvo da atividade anti-HSV-1. Desta forma, na seqüência deste estudo seria importante identificar, em bases moleculares, a(s) alteração (ões) nas variantes virais responsáveis por este fenótipo de resistência aos compostos (**167**) e (**183**), baseado no fato de que o(s) componente(s) virais envolvido(s) pode(m) representar, nas formas selvagens destes vírus, o potencial sítio de ligação para estes compostos.

Assim, a partir do processo de triagem da potencial atividade antiviral foi identificado que o composto **167** (Tabela 37) apresentou uma promissora atividade anti-HSV *in vitro* com valores de IS > 100, valor considerado significativo para que o

composto seja submetido a desenvolvimentos adicionais (KINCHINGTON et al., 1995). Os compostos **98** e **183**, apesar de apresentarem valores de IS < 100 (Tabelas 30 e 37, respectivamente), também foram selecionados para o estudo do mecanismo de ação, com o intuito de ampliar as possibilidades de identificação de novos alvos moleculares específicos e, conseqüentemente, com diferentes mecanismos daqueles que formam as terapias atuais.

O estudo do mecanismo de ação antiviral dos compostos identificados nos processos de triagem amplia as possibilidades de desenvolvimento de novos fármacos. A obtenção de informações mais detalhadas sobre o modo como os compostos antivirais atuam em nível molecular faz com que seja possível melhorar sua eficácia e diminuir sua citotoxicidade, e até minimizar os problemas advindos do aparecimento de resistência aos medicamentos antivirais já existentes, em pacientes submetidos a tratamentos de longa duração (KINCHINGTON et al., 1995). Podendo também servir como ponto de partida para o planejamento racional de novos fármacos antivirais.

Além disso, a química medicinal, dentro de suas inúmeras atribuições, permite que os compostos antivirais identificados no processo de triagem sejam, na seqüência, submetidos a uma análise detalhada das relações estrutura-atividade desses compostos, com o objetivo de otimizar a síntese de análogos estruturais mais ativos.

5.3 AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE LEISHMANICIDA DAS SULFONAMIDAS DERIVADAS DA 4-METOXICALCONA

Durante a realização desta tese, também foi avaliada a potencial atividade leishmanicida da série de sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona sintetizadas. Os ensaios de atividade leishmanicida foram desenvolvidos pela autora deste trabalho e pela bolsista Letícia Kramer Pacheco, no Laboratório de Protozoologia no Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina, sob a coordenação do Professor Dr. Mário Steindel.

As sulfonamidas derivadas da chalcona apresentaram atividade leishmanicida. A partir dos resultados obtidos foram realizados os estudos da relação estrutura-atividade (SAR) dessa série de sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona com o intuito de determinar as características estruturais e

eletrônicas que poderiam levar a atividade leishmanicida. Estes estudos foram realizados no LABioMol, Departamento de Biologia Celular e Molecular, IB-/CEG,- Universidade Federal Fluminense e no ModMolQSAR, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a coordenação dos professores Dra. Helena Carla Castro e Dr. Carlos R. Rodrigues, respectivamente.

Os resultados obtidos estão descritos no artigo **“Synthesis, Biological evaluation and SAR of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives with Potential Antileishmanial Activity”** (apêndice 1) que foi aceito para publicação na revista *European Journal of Medicinal Chemistry* (Fator de Impacto: 2,187 - JCR 2006).

6 CONCLUSÕES

- As sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona e as sulfonamidas derivadas de quinolina foram sintetizadas e caracterizadas.
- As sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona apresentaram baixas porcentagens de inibição da replicação do rotavírus e do HSV-1 cepas KOS e 29R/resistente ao aciclovir.
- As sulfonamidas derivadas da quinolina apresentaram baixas porcentagens de inibição da replicação do vírus RSV cepa A2, enquanto que, as sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona foram citotóxicas para as células HEp-2 nas concentrações de 100, 50 e 25 μ M.
- As sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona (**25**), (**28**) e (**29**), e as sulfonamidas derivadas de quinolina (**39**), (**40**) e (**42**) apresentaram baixos índices de seletividade para o HSV-2.
- Nos estudos da atividade antiviral das sulfonamidas derivadas de chalcona e sulfonamidas derivadas de quinolina as baixas porcentagens de inibição da replicação viral e os baixos índices de seletividade verificados indicam que as moléculas sintetizadas não são promissoras na pesquisa de novos fármacos com atividade antiviral frente aos vírus testados.
- Nos processos de triagem realizados, o composto (**98**) (2,2-dimetil-5-[(1,3,4-tiadiazol-2-amino)metileno]-1,3-dioxane-4,6-dione), uma celohexaose sulfatada (**167**) e um oligossacarídeo formado por duas unidades de lactose sulfatadas ligadas por um espaçador hidrofóbico específico do tipo C_6H_4 (**183**) apresentaram atividades antivirais promissoras.

Quanto ao composto (**98**) pode-se concluir que:

- Apresenta perfil promissor na inibição da replicação do vírus HSV-1 cepa 29R/resistente ao aciclovir, além de baixa atividade anti-RSV, e inibição de apenas 37% da replicação do HSV-2 cepa 333.
- A mudança do núcleo 1,3,4-tiadiazol por outros núcleos estruturalmente relacionados, tais como triazol, tiazole, bromotiazol, tiazolino e metiltiazol, levou a uma perda da atividade antiviral em relação ao HSV-1 cepa 29R. A presença de substituintes hidrofílicos ou lipofílicos no carbono 5 do núcleo

tiadiazólico, também levou a uma acentuada diminuição da atividade antiviral.

- O núcleo 1,3,4-tiadiazol é um possível grupo farmacofórico, isto é, a subunidade estrutural do composto (**98**) que seria responsável pela inibição da replicação do vírus HSV-1 cepa 29R.
- Não apresenta ação virucida sobre os vírus HSV-1 cepa 29R/resistente ao aciclovir, HSV-2 cepa 333 e RSV cepa A2.
- É capaz de inibir a replicação do HSV-1 cepa 29R/resistente ao aciclovir quando adicionado nas primeiras 3h pós-infecção.
- Apresenta atividade inibitória sobre a síntese da proteína α ICP27 e pequena supressão das proteínas γ , gB, gD e gE.
- Reduz a área das placas de lise formadas pelo HSV-1 cepa 29, sugerindo ter um potencial de interferir com a atividade de dispersão do HSV célula a célula.
- Não interfere na síntese do DNA viral.
- O mecanismo de ação anti-HSV-1 do composto, parece ser mediado em parte, pela inibição da dispersão célula a célula do HSV-1 cepa 29R e pela interferência em eventos imediatos de replicação deste vírus, através do bloqueio da síntese da proteína α ICP 27.

Com relação aos compostos (**167**) e (**183**) conclui-se que:

- Apresentam atividades anti-RSV e anti-HSV-1 e anti-HSV-2 promissoras, não demonstrando efeitos tóxicos sobre as células utilizadas.
- Não apresentam ação virucida sobre os vírus HSV-1 KOS 321, HSV-2 cepa 333 e RSV cepa A2.
- Reduzem a atividade de dispersão célula a célula do vírus HSV e em alguma extensão do RSV.
- Inibem a adsorção dos vírions purificados do HSV e do RSV às células, assim como, diminuem a capacidade de ligação das glicoproteínas de adsorção purificadas gB e gC do HSV-1 ou do HSV-2 às células GMK AH1.
- A presença de variantes resistentes aos compostos (**167**) e (**183**) nas cepas gC-negativas do HSV-1 sugere que, com exceção da gC, outro (s) componente (s) viral (s) poderiam ser alvo destes compostos durante o curso da infecção viral das células.

- Muitas das variantes do HSV-1 foram mais resistentes quando na presença do inibidor durante a dispersão dos vírus célula a célula do que na presença do inibidor durante a infecção inicial das células.
- O mecanismo de atividade antiviral dos compostos oligossacarídeos sulfatados **167** e **183** parece ser mediada pela inibição da dispersão viral célula a célula do HSV e pela interferência na ligação dos vírus às células glicosaminoglicanas das superfícies celulares. Os resultados indicaram, ainda, que outro(s) componente(s) viral(is), exceto a glicoproteína gC, poderia(m) estar também envolvidos(s) na atividade anti-HSV-1 detectada.

REFERÊNCIAS

ADAMIAK, B.; EKBLAD, M.; BERGSTRÖM, T.; FERRO, V.; TRYBALA, E. Herpes simplex virus type 2 glycoprotein G is targeted by the sulfated oligo- and polysaccharide inhibitors of virus attachment to cells. **J. Virol.** v. 81, n. 2, p.13424-13434, Dec. 2007.

AGUILAR, J.S.; RICE M.; WAGNER, E.K. The polysulfonated compound suramin blocks adsorption and lateral diffusion of herpes simplex virus type-1 in vero cells. **Virol.** v. 258, n.1, p. 141-51, May 1999.

AHMAD, A.L.; TYRRELL, D.A. Synergism between anti-rhinovirus antivirals: various human interferons and a number of synthetic compounds. **Antivir. Res.** v. 6, n. 4, p. 241-252, Jul 1986.

ALLAIN, J. P.; LAURIAN, Y.; PAUL, D. A.; SENN, D. Serological marker in early stages of human immunodeficiency virus infection in haemophiliacs. **Lancet** v. 2, n. 8518, p. 1233-1236, Nov 1986.

ALMELA, M.J.; GONZALEZ, M.E.; CARRASCO, L. Inhibitors of poliovirus uncoating efficiently block the early membrane permeabilization induced by virus particles. **J. Virol.** v. 65, n. 5, p. 2572-2577, May 1991.

AL-NAKIB, W.; HIGGINS, P.G.; BARROW, I.; TYRRELL, D.A.; LENOX-SMITH, I.; ISHITSUKA, H. Intranasal chalcone, Ro 09-0410, as prophylaxis against rhinovirus infection in human volunteers. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 20, n. 6, p. 887-892, Dec 1987.

AMARAL, A.T.; MONTANARI, C.A. Química Medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. **Quím. Nova**, v. 25, p. 39-44, 2002.

ANDRADE, E. da S. **Síntese, caracterização, atividades biológicas, estudo de modelagem molecular e correlação estrutura-atividade de benzenossulfonilaziridinas.** 2004. 212 f. Tese (Doutorado em Química) – Program de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2004.

ANDRICOPULO A.D.; MONTANARI C.A. Structure-activity relationships for the design of small-molecule inhibitors. **Mini. Rev. Med. Chem.** v. 5, n. 6, p. 585-93, Jun 2005.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; SILVA, L.E.; Nunes, R. J.; SIMÕES, C.M.O.; FORO, S. N-Benzylquinoline-8-sulfonamide. **Acta Cryst.** Section E, v. 62, p. 03693 - 03694, 2006.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; JOUSSEF, A.C.; SIMÕES, C.M.O.; NUNES R.J.; BORTOLUZZI, A. J. 5-(2-Benzoylphenyl)-N-benzyl-2 methoxybenzenesulfonamide. **Acta Cryst.** Section E., v. 63, p. 03275 - 03276, 2007a.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; SILVA, L.E.; SIMÕES, C.M.O.; NUNES, R.J.; FORO, S. N-(4-Methoxybenzyl)quinoline-8-sulfonamide. **Acta Cryst.** Section E, v. 63, p. 03059-03060, 2007b.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; SILVA, L.E.; SIMÕES, C.M.O.; NUNES, R.J.; FORO, S. 8-(Piperidin-1-ylsulfonyl)quinoline. **Acta Cryst.** Section E, v. 63, p.01638-01639, 2007c.

ARDUINO, P.G.; PORTER, S.R. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. **J. Oral Pathol. Med.** v. 37, n. 2, p. 107-121, Feb 2008.

BABA, M.; SNOECK, R.; PAUWELS, R.; DE CLERCQ, E. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. **Antimicrob. Agents Chemother** v. 32, n. 11, p. 1742-5, Nov 1988.

BAIRD, J.K. Effectiveness of antimalarial drugs. **N. Engl. J. Med.** v. 14, n. 15, p.1565-1577, Apr 2005.

BARARDI, C.R.M.; EMSLIE, K.R.; VESEY, G.; WILLIAMS, K.L. Development of a rapid and sensitive quantitative assay for rotavirus based on flow cytometry. **J. Virol. Methods** v. 74, n. 1, p. 31-37, Set 1998.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química medicinal:** as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: ArtMed, 2002. 243p.

BASSIN, J.P.; CREMLYN, R.J.; SWINBOURNE, F.J. Chlorosulfonation of aromatic and heteroaromatic systems. **Phosph. Sulfur** v. 56, p. 24-275, 1991.

BAUMEISTER, J.; FISCHER, R.; ECKENBERG, P.; HENNINGER, K.; RUEBSAMEN-WAIGMANN, H. KLEYMANN, G. Superior efficacy of helicase-primase inhibitor BAY 57-1293 for herpes infection and latency in the guinea pig model of human genital herpes disease. **Antivir. Chem. Chemother** v. 18, n.1, p. 35-48, 2007.

BHATTACHARJEE, A.K.; NICHOLS, D.A.; GERENA, L.; RONCAL, N.; GUTTERIDGE, C.E. An in silico 3D pharmacophore model of chalcones useful in the design of novel antimalarial agents. **Med. Chem.** v. 3, n. 4, p. 317-326, Jul 2007.

BERGEFALL, K. **Interaction of Herpes Simplex Virus with cell surface glycosaminoglycans as a target for antiviral intervention.** 2005. 54 p. Thesis (Doctor of Philosophy in Microbiology) – Department of Clinical Virology, Göteborg University, Goteborg, 2005.

BETZ, G.; NOWBAKHT, P.; IMBODEN, R.; IMANIDIS, G. Heparin penetration into and permeation through human skin from aqueous and liposomal formulations in vitro. **Int. J. Pharm.** v. 228, n. 1-2, p. 147-159, Oct 2001.

BETZ, U.A.; FISCHER, R.; KLEYMANN, G.; HENDRIX, M.; RUEBSAMEN-

WAIGMANN, H. Potent in vivo antiviral activity of the herpes simplex virus primase-helicase inhibitor BAY 57-1293. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 46, n. 6, p. 1766-72, Jun 2002.

BONE, R.; SALEMME, R. The integration of structure-based design and directed combinatorial chemistry for new pharmaceutical discovery. In: VEERAPANDIAN, P. (Ed.) **Structure-based drug design**. New York; Marcel Dekker, 1997. p. 525-539.

BONINA, L.; ORZALESI, G.; MERENDINO, R.; ARENA, A.; MASTROENI, P. Structure-activity relationships of new antiviral compounds. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 22, n. 6, p. 1067-1069, Dec 1982.

BOULWARE, S.L.; BRONSTEIN, J.C.; NORDBY, E.C.; WEBER, P.C. Identification and characterization of a benzothiophene inhibitor of herpes simplex virus type 1 replication which acts at the immediate early stage of infection. **Antivir. Res.** v. 51, n. 2, p. 111-125, Aug 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADY, R.C.; BERNSTEIN, D.I. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antivir. Res.** v. 61, n. 2, p. 73-81, Feb 2004.

BRIDEAU, R.J.; KNECHTEL, M.L.; HUANG, A.; VAILLANCOURT, V.A.; VERA, E.E.; OIEN, N.L.; HOPKINS, T.A.; WIEBER, J.L.; WILKINSON, K.F.; RUSH, B.D.; SCHWENDE, F.J.; WATHEN, M.W. Broad-spectrum antiviral activity of PNU-183792, a 4-oxo-dihydroquinoline, against human and animal herpesviruses. **Antivir. Res.** v. 54, n. 1, p. 19-28, Apr 2002.

BRUNO, I. J.; COLE, J. C.; KESSLER, M.; LUO, J.; MOTHERWELL, W. D. S.; PURKIS, L. H.; SMITH, B. R.; TAYLOR, R.; COOPER, R. I.; HARRIS, S. E.; ORPEN, A. G. Retrieval of Crystallographically-Derived Molecular Geometry Information. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.** v. 44, n. 6, p. 2133-2144, Dec 2004.

BUCHMANN, G.; SCHALINATUS, E.. 8-Quinolinesulfonyl chloride as starting material for quinolylsulfonamides. **J. Praktische Chemie** v. 16, p. 152-165, 1962.

BURLESON, F.G.; CHAMBERS, T.M.; WIEDBRAUK, D.L. **Virology**: a laboratory manual. San Diego: Academic, 1992. 250 p.

CABRERA, M.; SIMOENS, M.; FALCHI, G.; LAVAGGI, M.L.; PIRO, O.E.; CASTELLANO, E.E.; VIDAL, A.; AZQUETA, A.; MONGE, A.; DE CERÁIN, A.L.; SAGRERA, G.; SEOANE, G.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: biological evaluation and structure-activity relationships. **Bioorg. Med. Chem.** v. 15, n. 15, p. 3356-3367, May 2007.

CARLUCCI M.J.; CIANCIA M.; MATULEWICZ M.C.; CEREZO A.S.; DAMONTE E.B. Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. **Antivir. Res.** v. 43, n. 2, p. 93-102, Sep 1999.

CARLUCCI, M.J.; SCOLARO, L.A.; DAMONTE, E.B. Herpes simplex virus type 1 variants arising after selection with an antiviral carrageenan: lack of correlation between drug susceptibility and syn phenotype. **J. Med. Virol.** v. 68, n. 1, p.92-98, Sep 2002.

CASSADY, K.A., WHITLEY, R.J. New therapeutic approaches to the alphaherpesvirus infections. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 39, n. 2, 119-28, Feb 1997.

CECHINEL FILHO, V.; DE CAMPOS, F.; CORRÊA, R.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. **Quím. Nova**, v. 26, n. 2, p. 230-241, 2003.

CESARIN-SOBRINHO, D.; NETTO-FERREIRA, J. C.; BRAZ-FILHO, R. Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalcona. **Quím. Nova** v. 24, p.604-611, 2001.

CHESHENKO, N.; HEROLD, B.C. Glycoprotein B plays a predominant role in mediating herpes simplex virus type 2 attachment and is required for entry and cell-to-cell spread. **J. Gen. Virol.** v. 83, n. 9, p. 2247-2255, Sep 2002.

CHESHENKO, N.; KELLER, M.J.; MASCASULLO, V.; JARVIS, G.A.; CHENG, H.; JOHN, M.; LI, J.H.; HOGARTY, K.; ANDERSON, R.A.; WALLER, D.P.; ZANEVELD, L.J.; PROFY, A.T.; KLOTMAN, M.E.; HEROLD, B.C. Candidate topical microbicides bind herpes simplex virus glycoprotein B and prevent viral entry and cell-to-cell spread. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 48, n. 6, p. 2025-2036, Jun 2004.

CHIBALE, K.; MUSONDA, C.C. The synthesis of parasitic cysteine protease and trypanothione reductase inhibitors. **Curr. Med. Chem.** v. 10, n. 18, p. 1863-1889 Sep 2003.

COLBERE, F. L'herpèsvirus simplex: structure, replication et biologie. **B. I. Pasteur.** v. 73, p. 203-254, 1975.

CORRÊA, R. **Síntese de compostos imídicos cíclicos de interesse biológico.** 1997. 166 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1997.

COSTELLO, M.; SABATINI, L.; YUNGBLUTH, P. Herpes Simplex Virus Infections and Current Methods for Laboratory Detection. **Clin. Microbiol. Newsletter** v. 28, n. 24, p. 185-192, Dec 2006.

CREMLYN, J. R.; SWINBOURNE, F.J.; YUNG, K-M. Some Heterocyclic Sulfonyl chlorides and Derivatives. **J. Heterocyclic. Chem.** v. 18, p. 997-1006, 1980.

CREMLYN, J. R.; SWINBOURNE, F.J.; SHODE, O.O. Some reactions of chalcone-4-

sulfonyl chloride and 4-methoxychalcone-3-sulfonyl chloride. **J. Chin. Chem. Soc.** v. 31, p. 383-390, 1984.

CREMLYN, R.J.; SWINBOURNE, F.J.; BASSIN, P.; DANE, D.; HIGGINS, K.; MITCHELL, P.; CAVALEIRO, J. A. S.; DOMINGUES, F. J.; DIAS, M. Sulfonyl chalcones. **Phosphorus Sulfur** v. 63, p. 385-395, 1991.

DA SILVA, A.G. Propriedades gerais dos herpesvirus. In: LUPI, O.; DA SILVA, A.G.; PEREIRA JR, A.C. (Org.). **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**, p. 1-14, Rio de Janeiro: Medsi, 2000.

DAI-JU, J.Q.; LI, L.; JOHNSON, L.A.; SANDRI-GOLDIN, R.M. ICP27 interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II and facilitates its recruitment to herpes simplex virus 1 transcription sites, where it undergoes proteasomal degradation during infection **J. Virol.** v. 80, n. 7, p. 3567-3581, Apr 2006.

DE CLERCQ, E. New inhibitors of human cytomegalovirus (HCMV) on the horizon. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.51, p.1079-1083, 2003.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. **J. Clin. Virol.**, v. 30, n. 2, p.115-33, Jun 2004a.

DE CLERCQ, E. Antivirals and antiviral strategies. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 704-720, 2004b.

DE OLIVEIRA, K.N. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade biológica de sulfonamidas e sulfonilhidrazonas**. 2004. 126 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2004.

DE TOMMASI, N.; PIZZA, C.; AQUINO, R.; CUMANDA, J.; MAHMOOD, N. Flavonol and chalcone ester glycosides from *Bidens leucantha*. **J. Nat. Prod.** v. 60, n. 3, p. 270-273, Mar 1997.

DELFIN, D.A.; BHATTACHARJEE, A.K.; YAKOVICH, A.J.; WERBOVETZ, K.A. Activity of and initial mechanistic studies on a novel antileishmanial agent identified through in silico pharmacophore development and database searching. **J. Med. Chem.** v. 13, n. 49, p. 4196-4207, Jul 2006.

DIETERLE, W.; MANN, J.; KUTZ, K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the ETA-selective endothelin receptor antagonist SPP301 in healthy human subjects. **J. Clin. Pharmacol.** v.44, n. 1, p.59-66, Jan 2004.

DIMMOCK, J.R.; ELIAS, D.W.; BEAZELY, M.A.; KANDEPU, N.M. Bioactivities of chalcones. **Curr. Med. Chem.** v. 6, n. 12, p.1125-49, Dec 1999.

DREW J. Drug discovery: a historical perspective. **Science**. v. 287, p. 1960-1964, 2000.

DUFF, R.; RAPP, F. Oncogenic transformation of hamster cells after exposure to

herpes simplex virus type 2. **Nature New Biol.** v. 233, n. 36, p. 48-50, Sep 1971.

EBBERT J.O.; LIMPER A.H. Respiratory syncytial virus pneumonitis in immunocompromised adults: clinical features and outcome. **Respiration** v. 72, n. 3, p. 263-269, May-Jun 2005.

EKBLAD, M.; ADAMIAK, B.; BERGEFALL, K.; NENONEN, H.; ROTH, A.; BERGSTROM, T.; FERRO, V.; TRYBALA, E. Molecular basis for resistance of herpes simplex virus type 1 mutants to the sulfated oligosaccharide inhibitor PI-88. **Viol.** v. 367, n. 2, p. 244-252, Oct 2007.

EKBLAD, M.; BERGSTRÖM, T.; BANWELL, M.G.; BONNET, M.; RENNER, J.; FERRO, V.; TRYBALA, E. Anti-herpes simplex virus activities of two novel disulphated cyclitols. **Antivir. Chem. Chemother.** v. 17, n. 2, p. 97-106, 2006.

EKBLAD, M. **Anti-herpes simplex virus activities of sulfomannan oligosaccharide PI-88 and disulfated cyclitols.** 2007. 44 p. Thesis (Doctor of Philosophy in Microbiology) – Department of Clinical Virology, Göteborg University, Goteborg, 2007.

ELLISON, K. S.; MARANCHUK, R. A.; MOTTET, K. L.; SMILEY, J. R. Control of VP16 translation by the herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP27. **J. Virol.** v. 79, n. 7, p. 4120-4131, Apr 2005.

FARHAT, C.K.; CINTRA, A.L.; TREGNAGHI, M.W. Vacinas e o trato respiratório – o que devemos saber? **J. Pediatr.** v. 78, n. 2, p. 195-204, nov./dez. 2002.

FEYZI, E., TRYBALA, E., BERGSTROM, T., LINDAHL, U., SPILLMANN, D. Structural requirement of heparan sulfate for interaction with herpes simplex virus type 1 virions and isolated glycoprotein C. **J. Biol. Chem.** v. 272, n. 40, p. 24850-24857, Oct 1997.

FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MALCOLM, A.M.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (eds.) **Fields Virology.** 4th ed. v. 1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

FLINT, S.J.; ENQUIST, L.W.; KRUG, R.M.; RACANIELLO, V.R.; SKALKA, A.M. **Principles of virology:** molecular, biology, pathogenesis and control. Washington: ASM, 2000. p. 662-714.

FLASEY, A.R., WALSH, E.E. Respiratory syncytial virus infection in adults. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 13, p. 371–384, 2000.

FALSEY, A.R.; WALSH, E.E., Viral pneumonia in older adults. **Clin. Infect. Dis.** v. 15, p. 518–524, Jan 2006.

GABER, A.E.A. M.; McNAB, H. Synthetic applications of the pyrolysis of Meldrum's Acid derivatives. **Synthesis.** v. 14, p. 2059-2074, 2001.

GILGER, M.A.; MATSON, D.O.; CONNER, M.E.; ROSENBLANTT, H.M.;

FINEGOLD, M.J.; ESTES, M.K. Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. **The J. of Pediatr.** v. 120, n. 6, p. 912-917, Jun 1992.

GIRAD, M.; HIRTH, L. **Virologie Moléculaire**. 2ème. ed. Paris: Doin, 1989. 617 p.

GO, M.L.; LIU, M.; WILAIRAT, P.; ROSENTHAL, P.J.; SALIBA, K.J.; KIRK, K. Antiplasmodial chalcones inhibit sorbitol-induced hemolysis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 48, n. 9, p. 3241-3245, Sep 2004.

GO, M.L.; WU, X.; LIU, X.L. Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. **Curr. Med. Chem.** v.12, n. 4, p. 481-99, 2005.

GRECO, A.; DIAZ, J.J.; THOUVENOT, D.; MORFIN, F. Novel targets for the development of anti-herpes compounds. **Infect. Disord. Drug Targets.** v. 7, n. 1, p.11-18, Mar 2007.

GUNALP, A. Growth and cytopathic effect of rubella virus in a line of green monkey kidney cells. **Proc. Soc. Exp. Biol.** v. 118, p. 185-190, 1965.

GUPTA, C.K., LESZCZYNSKI, J.; GUPTA, R.K., SIBER, G.R. Stabilization of respiratory syncytial virus (RSV) against thermal inactivation and freeze-thaw cycles for development and control of RSV vaccines and immune globulin. **Vaccine** v.14, n. 15, p. 1417-1420. Oct 1996.

GUPTA, R.; WARREN, T.; WALD, A. Genital herpes. **Lancet.** v. 22, n. 370, p. 2127-2137 Dec 2007.

HALLAK, L.K., COLLINS, P.L., KNUDSON, W., PEEPLES, M.E. Iduronic acid-containing glycosaminoglycans on target cells are required for efficient respiratory syncytial virus infection. **Viol.** v. 271, n. 2, p. 264-275, Jun 2000a.

HALLAK, L.K., SPILLMANN, D., COLLINS, P.L., PEEPLES, M.E., Glycosaminoglycan sulfation requirements for respiratory syncytial virus infection. **J. Virol.** v. 74, n. 22, p.10508-10513, Nov 2000b.

HARTER, W.G.; ALBRECT, H.; BRADY, K.; CAPRATHE, B.; DUNBAR, J.; The design and synthesis of sulfonamides as caspase-1 inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v.14, n. 3, p. 809-812, Feb 2004.

HARTLINE, C.B.; HARDEN, E.A.; WILLIAMS-AZIZ, S.L.; KUSHNER, N.L.; BRIDEAU, R.J.; KERN, E.R. Inhibition of herpesvirus replication by a series of 4-oxo-dihydroquinolines with viral polymerase activity. **Antivir. Res.** v. 65, n. 2, p.97-105, Feb 2005.

HATANO, T.; YASUHARA, T.; MIYAMOTO, K.; OKUDA, T. Anti-human immunodeficiency virus phenolics from licorice. **Chem. Pharm. Bull.** v. 36, n. 6, p. 2286-2288, Jun 1988.

HEROLD, B.C.; VISALLI, R.J.; SUSMARSKI, N.; BRANDT, C.R.; SPEAR, P.G. Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. **J. Gen. Virol.** v. 75, n. 6, p. 1211-1222, Jun 1994.

HEROLD, B.C.; GERBER, S.I.; BELVAL, B.J.; SISTON, A.M.; SHULMAN, N. Differences in the susceptibility of herpes simplex virus types 1 and 2 to modified heparin compounds suggest serotype differences in viral entry. **J. Virol.** v. 70, n. 6, p. 3461-3469, Jun 1996.

HOGGAN, M.D.; ROIZMAN, B. The isolation and properties of a variant of herpes simplex producing multinucleated giant cells in monolayer cultures in the presence of antibody. **Am. J. Hyg.** v.70, p. 208-219, Sep 1959.

HOLLAND, T.C.; MARLIN, S.D.; LEVINE, M.; GLORIOSO, J. Antigenic variants of herpes simplex virus selected with glycoprotein-specific monoclonal antibodies. **J. Virol.** v. 45, p. 672-682, 1983.

HOLLAND, T.C.; HOMMA, F.L.; MARLIN, S.D.; LEVINE, M.; GLORIOSO, J. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein C-negative mutants exhibit multiple phenotypes, including secretion of truncated glycoproteins. **J. Virol.** v. 52, p.566-574, 1984.

HSIEH, H.K.; TSAO, L.T.; WANG, J.P.; LIN, C.N. Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 52, n. 2, p.163-171, Feb 2000.

HERMOSO, A.; JIMENEZ, I.A.; MAMANI, Z.A.; BAZZOCCHI, I.L.; PINERO, J.E.; RAVELO, A.G.; VALLADARES, B. Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *piper elongatum* and synthetic related compounds: Structural requirements for activity. **Bioorg. Med. Chem.** v. 11, n. 18, p. 3975-80, Sep 2003.

HUANG X.; LIU Z. Solid-phase synthesis of 4(1H)-quinolone and pyrimidine derivatives based on a new scaffold-polymer-bound cyclic malonic acid ester. **J. Org. Chem.** v. 67, p. 6731-6737, 2002.

ISHITSUKA, H.; NINOMIYA, Y.T.; OHSAWA, C.; FUJII, M.; SUHARA, Y. Direct and specific inactivation of rhinovirus by chalcone Ro 09-0410. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 22, n. 4, p. 617-621, Oct 1982.

JEAN, S.; LEVAN, K. M.; SONG, B.; LEVINE, M.; KNIPE, D. M. Herpes simplex virus 1 ICP27 is required for transcription of two viral late (α 2) genes in infected cells. **Virol.** v. 283, p. 273-284, 2001.

KANEKO, H.; KEIICHIRO, K.; MORI, S.; SHIGETA, S. Antiviral activity of NMSO3 against adenovirus *in vitro*. **Antivir. Res.**, v. 52, n. 3, p. 281-288, Dec 2001.

KAROLI, T.; LIU L.; FAIRWEATHER, J.K.; HAMMOND, E.; LI, C.P.; COCHRAN, S.; BERGEFALL, K.; TRYBALA, E.; ADDISON, R.S.; FERRO, V. Synthesis, biological activity, and preliminary pharmacokinetic evaluation of analogues of a

phosphosulfomannan angiogenesis inhibitor (PI-88). **J. Med. Chem.** v. 48, n. 26, p. 8229-8236, Dec 2005.

KARGER, A.; METTENLEITER, T.C., Glycoproteins gIII and gp50 play a dominant roles in the biphasic attachment of pseudorabies virus. **Virology**. v. 194, n. 2, p. 654:664, Jun 1993.

KAUFMAN, H.E.; VARNELL, E.D.; GEBHARDT, B.M.; THOMPSON, H.W.; ATWAL, E.; RÜBSAMEN-WAIGMANN, H.; KLEYMANN, G. Efficacy of a Helicase-Primase Inhibitor in Animal Models of Ocular Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. **J. Ocul. Pharmacol. Ther.** Jan 2008 (*in press*).

KINCHINGTON, D.; KANGRO, H.; JEFFRIES, D. J. Design and testing of antiviral compounds. In: DESSELBERGER, U. (Ed.). **Medical Virology: a practical approach**. Oxford: University, 1995. p.147-171.

KLEYMANN, G. New antiviral drugs that target herpesvirus helicase primase enzymes. **Herpes**. v. 10, n. 2, p. 46-52, Aug 2003.

KECSKEMETI, V.; BAGI, Z.; PACHER, P.; POSA, I.; KOCSIS, E.; KOLTAI, M.Z. New trends in the development of oral antidiabetic drugs. **Curr. Med. Chem.** v. 9, n. 1, p. 53-71, Jan 2002.

KRATZ, J.M. **Estudo do mecanismo da ação anti-herpética do ácido gálico e do galato de pentila**. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

KROMANN, H.; LARSEN, M.; BOESEN, T.; SCHONNING, K.; NIELSEN, SF. Synthesis of prenylated benzaldehydes and their use in the synthesis of analogues of licochalcone A. **Eur. J. Med. Chem.** v. 39, n. 11, p.993-1000, Nov 2004.

KUBINYI, H. Combinatorial and Computational approaches in structure-based drug design. **Curr. Opin. Drug Discov.**, v. 1, 16-27, 1998.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Mol. Aspects Med.** v. 27, n. 2-3, p. 95-125, Apr-Jun 2006.

KUO, Y. C.; CHEN, C. C.; TSAI, W. J.; HO, Y. H.. Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by *Psychotria serpens*: relationship to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. **Antivir. Res.** v. 51, n. 2, p. 95-109, Aug 2001.

LALL, N.; HUSSEIN, A.A.; MEYER, J.J. Antiviral and antituberculous activity of Helichrysum melanacme constituents. **Fitoterapia**. v. 77, n. 3, p. 230-232, Apr 2006.

LEUNG, A.K.; KELLNER, J.D., DAVIES, H.D. Respiratory syncytial virus bronchiolitis. **J. Natl. Med. Assoc.** v. 97, n. 12, p. 1708-1713, Dec 2005.

LEVIN M.J.; BACON T.H.; LEARY J.J. Resistance of herpes simplex virus infections to nucleoside analogues in HIV-infected patients. **Clin. Infect. Dis.** v. 39, Suppl 5, p. 248-257, Nov 2004.

LEWIS, F.A.; RAE, M.L.; LEHMANN, N.I.; FERRIS, A.A. A syncytial virus associated with epidemic disease of the lower respiratory tract in infants and young children. **Med. J. Aust.** v. 2, p. 932-933, 1961.

LIU, J.; THORP, S.C. Cell surface heparan sulfate and its roles in assisting viral infections. **Med. Res. Rev.** v. 22, n. 1, p. 1-25, Jan 2002.

LITVINOV, V. P. DOTSENKO, V. V.; KRIVOKOLYSKO, S. G Thienopyridines: synthesis, properties, and biological activity. **Russian Chem. Bull.** v. 54, p. 864-904, 2005.

LOPEZ, S.N.; CASTELLI, M.V.; ZACCHINO, S.A. *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivative and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. **Bioorg. Med. Chem.** v. 9, n. 8, p. 1999-2013, Aug 2001.

LUNARDI, F.; GUZELA, M.; RODRIGUES, A.T.; CORREA, R.; EGER-MANGRICH, I.; STEINDEL, M.; GRISARD, E.C.; ASSREUY, J.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R. Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 47, n. 4, p.1449-1451, Apr 2003.

LUPI, O.; PEREIRA JR, A.C. Herpes simples. In: LUPI, O.; DA SILVA, A.G.; FERREIRA JR, A.C. **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento.** Rio de Janeiro: Medsi, p. 43-70, 2000.

LYCKE, E.; JOHANSSON, M.; SVENNERHOLM, B.; LINDAHL, U., Binding of herpes simplex virus to cellular heparan sulphate, an initial step in the adsorption process. **J. Gen. Virol.** v. 72, 1131-1137, May 1991.

MADRID, P.B.; SHERRILL, J.; LIOU, A.P.; WEISMAN, J.L.; DERISI, J.L.; GUY, R.K. Synthesis of ring-substituted 4-aminoquinolines and evaluation of their antimalarial activities. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 15, n. 4, p. 1015-1018 Feb 2005.

MAcNAB, H. Chemistry without reagents: synthetic applications of Flash Vacuum Pyrolysis. **Aldrichim. Acta.** v. 37, p. 19-26, 2004.

MARCELETTI, J.R. Synergistic inhibition of herpesvirus replication by docosanol and antiviral nucleoside analogs. **Antivir. Res.**, v. 56, n. 2, p. 153-166, Nov 2002.

MÅRDBERG, K.; TRYBALA, E.; TUFARO, F.; BERGSTRÖM, T. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein C is necessary for efficient infection of chondroitin sulfate-expressing gro2C cells. **J. Gen. Virol.** v. 83, n. 2, v. 291-300, Feb 2002.

MCDONALD, T.P.; JEFFREE, C.E.; LI, P.; RIXON, H.W.; BROWN, G.; AITKEN, J.D., MACLELLAN, K., SUGRUE, R.J. Evidence that maturation of the N-linked glycans of the respiratory syncytial virus (RSV) glycoproteins is required for virus-mediated cell

fusion: The effect of alpha-mannosidase inhibitors on RSV infectivity. **Virol.** v. 350, n.2, p. 289-301, Jul 2006.

MELEGARI, M.; VAMPA, G.; BENEDETTI, L.; DE BENEDETTI, P.G. Preparation and spectroscopic behavior of acetyl derivatives of sulphonamides. **Farmaco.** v. 31, n. 3, p. 183-193, Mar 1976.

MICHAEL, JP. Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. **Nat. Prod. Rep.** v. 24, n. 1, p. 223-246, Feb 2007.

MONTANARI, C.A. A química medicinal na próxima década. **Quím. Nova**, v. 23, p. 134-137, 2000.

NADAL, S.R.; NADAL, L.R.M. Tumores perianais provocados pelo herpes simples. **Rev. Bras. Colo-Proctol.** v. 27, n.1, Jan./Mar. 2007.

NAHMAS, A.J.; KIBRICK, S. Inhibitory effect of heparin on herpes simplex virus. **J. Bacteriol.** v.87. n. 5, p. 1060-1066, Mar 1964.

NAMVAR, L.; OLOFSSON, S.; BERGSTRÖM, T.; LINDH, M. Detection and typing of Herpes Simplex virus (HSV) in mucocutaneous samples by TaqMan PCR targeting a gB segment homologous for HSV types 1 and 2. **J. Clin. Microb.** v. 43, n. 5, p. 2058-2064, May 2005.

NEYTS, J., DE CLERCQ, E. Effect of polyanionic compounds on intracutaneous and intravaginal herpesvirus infection in mice: impact on the search for vaginal microbicides with anti-HIV activity. **J. Acquir. Immune Def. Synd. Hum. Retrovirol.** v. 10, n. 1, p. 8-12, Sep 1995.

NEWELL, D. R. How to develop a successful cancer drug-molecules to medicines or targets to treatments? **Eur. J. Cancer.** v.41, n. 5, p.676-82, Mar 2005.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. SANDER M.K. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Products.** v. 66, n. 7, p. 1022-1037, Jul 2003.

NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. **Curr. Opin. Chem. Biol.** v.6, n. 3, p.297-305, Jun 2002.

NIELSEN, S.F. BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHONNING, K.; KROMANN, H. Antibacterial chalcones--bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. **Bioorg. Med. Chem.** v. 12, n. 11, p. 3047-3054, Jun 2004.

NINOMIYA, Y.; OHSAWA, C.; AOYAMA, M.; UMEDA, I.; SUHARA, Y.; ISHITSUKA, H. Antivirus agent, Ro 09-0410, binds to rhinovirus specifically and stabilizes the virus conformation. **Virol.** v. 30, n. 2, p. 269-276, Apr 1984.

NINOMIYA, Y.; SHIMMA, N.; ISHITSUKA, H. Comparative studies on the antirhinovirus activity and the mode of action of the rhinovirus capsid binding agents,

chalcone amides. **Antivir. Res.** v. 13, n. 2, p.61-74, Feb 1990.

NUNES, R. J. The Chemistry na biological activity of cyclic imidobenzenesulfonyl derivatives. 1986. 212 p. Thesis. (Doctor of Philosophy in Organic Chemistry) - Hatfield Polytechnic, Hatfield, England 1986.

NYBERG, K.; EKBLAD, M.; BERGSTROM, T.; FREEMAN, C.; PARISH, C.R.; FERRO, V.; TRYBALA, E. The low molecular weight heparan sulfate-mimetic, PI-88, inhibits cell-to-cell spread of herpes simplex virus. **Antivir. Res.** v. 63, n. 1, p. 15-24, Jul 2004.

OIEN, N.L.; BRIDEAU, R.J.; HOPKINS, T.A.; WIEBER, J.L.; KNECHTE, M.L.; SHELLY, J.A. et al. Broad-spectrum antiherpes activities of 4-hydroxyquinoline carboxamides, a novel class of herpesvirus polymerase inhibitors. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 46, n. 3, p.724-730, Mar 2002.

OLOFSSON, S.; BOLMSTEDT, A.; BILLER, M.; MARDBERG, K.; LECKNER, J.; MALMSTROM, B.G.; TRYBALA E.; BERGSTROM T. The role of a single N-linked glycosylation site for a functional epitope of herpes simplex virus type 1 envelope glycoprotein gC. **Glycobiology** v. 9, n. 1 p. 73-81, Jan 1999.

OWA, T.; OKAUCHI, T.; YOSHIMATSU, K.; SUGI, N.H.; OZAWA, Y. A focused compound library of novel N-(7-indolyl)benzenesulfonamides for the discovery of potent cell cycle inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v.10, n. 11, p.1223-1226, Jun 2000.

PARISH, C.R.; FREEMAN, C.; BROWN, K.J.; FRANCIS, D.J.; COWDEN, W.B. Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel in vitro assays for angiogenesis and heparanase activity. **Cancer Res.** v. 59, n. 14, p. 3433-3441, Jul 1999.

PAVIA D. L.; LAMP, G. M.; KRIZ, G. S.; ENGEL, R. G. **Introduction to organic laboratory techniques.** New York: Saunders College Publishing, p. 310-321, 1998.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. ; ENGEL, R.G. **Introduction to Organic Laboratory Techniques: a small-scale approach.** 2nd ed. Belmont (CA): Brooks/Cole-Thomson Learning, 2005. p. 324.

PARASHAR, U.D.; HUMMELMAN, E.G.; BRESEE, J.S.; MILLER, M.A.; GLASS, R.I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerg. Infect Dis.** v. 9, n. 5, p. 565-572, May 2003.

PAROLIN, C.; GATTO, B.; DEL VECCHIO, C.; PECERE, T.; TRAMONTANO, E.; CECCHETTI, V.; FRAVOLINI, A.; MASIERO, S.; PALUMBO, M.; PALU, G. New anti-human immunodeficiency virus type 1 6-aminoquinolones: mechanism of action. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.47, n. 3, p. 889-896, Mar 2003.

Patent, 464850, 1965 - STERLING DRUG, INC. Aromatic Amine Derivatives and Preparation. **Chem. Abstract.** 1,147,759, 1966.

PATRICK, G.L. **An introduction to Medicinal Chemistry**. 2nd, Oxford: Oxford University, 2001. 622 p.

PHILLPOTTS, R.J.; HIGGINS, P.G.; WILLMAN, J.S.; TYRREL, D.A.; LENOX-SMITH, I. Evaluation of the antirhinovirus chalcone Ro 09-0415 given orally to volunteers. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 14, n. 4, p. 403-409, Oct 1984.

PENG, L.; ZHANG, T.; LI, Y.; LI, Y.; Synthesis of pyrazole derivatives 4(1H)-quinolone and 4-chloroquinoline by thermolysis of arylaminomethylene Meldrum's acid derivative **Synth. Commun.** v. 32, p. 785-791, 2002.

PENNING, T.D.; KHILEVICH, A.; CHEN, B.B.; RUSSELL, M.A.; BOYS, M.L.; WANG, Y.; DUFFIN, T. Synthesis of pyrazoles and isoxazoles as potent $\alpha(v)\beta\alpha3$ receptor antagonists. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 16, n. 12, p. 3156-3161, Jun 2006.

PERTEL, P.E.; SPEAR, P.G. Modified entry and syncytium formation by herpes simplex virus type 1 mutants selected for resistance to heparin inhibition. **Virology** v. 226, n. 1, p. 22-33, Dec 1996.

PETERSEN, E. Malaria chemoprophylaxis: when should we use it and what are the options? **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.** v. 2, n. 1, p. 119-132, Feb 2004.

PONCE, N.M.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B.; FLORES, M.L.; STORTZ, C.A. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. **Carbohydr. Res.** v. 338, n. 2, p.153-165, Jan 2003.

PRANDOTA, J. Furosemide: progress in understanding its diuretic, anti-inflammatory, and bronchodilating mechanism of action, and use in the treatment of respiratory tract diseases. **Am. J. Ther.** v. 9, n. 4, p. 317-328, Jul-Aug 2002.

RAAKE, W.; KLAUSER, R.J.; ELLING, H.; MEINETSBERGER, E. Anticoagulant and antithrombotic properties of synthetic sulfated bis-lactobionic acid amides. **Thromb Res.** v. 56, n. 6, p. 719-730, Dec 1989.

REEFSCHLAEGER, J.; BENDER, W.; HALLENBERGER, S.; WEBER, O.; ECKENBERG, P.; GOLDMANN, S.; HAERTER, M.; BUERGER, I.; TRAPPE, J. Novel non-nucleoside inhibitors of cytomegaloviruses (BAY 38-4766): in vitro and in vivo antiviral activity and mechanism of action. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 48, n. 6, p. 757-767, Dec 2001.

REIS, A. D. **Incidência de doenças de vias aéreas pelo vírus sincicial respiratório humano em coorte de recém-nascidos do município de São Paulo: comparação de técnicas diagnósticas e caracterização molecular**. 2006.132 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ROSSELLO, A.; NUTI, E.; CATALANI, M.P.; CARELLI, P.; ORLANDINI, E. A new development of matrix metalloproteinase inhibitors: twin hydroxamic acids as potent inhibitors of MMPs. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 15, n. 9, p. 2311-2314, May 2005.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D.M. Herpes Simplex virus and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MALCOLM, **A.M.**; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (eds.) **Fields Virology**. 4th ed. v. 1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

SANTOS, L. dos; **Avaliação dos potencial hipolipemiante de algumas chalconas sintéticas utilizando diferentes modelos experimentais**. 2003. 157 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Divisão de Imunização e Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Coordenadoria de Controle de Doenças. Vaccine against rotavirus Vacina contra rotavirus. **Rev. Saúde Pública**. v.40, n. 2, p. 355-358, 2006.

SCHLEISS, M.R.; BERNSTEIN, D.I.; MCVOY, M.A.; STROUP, G.; BRAVO, F.; CREASY, B.; MCGREGOR, A.; HENNINGE, R.K.; HALLENBERGE, S. The non-nucleoside antiviral, BAY 38-4766, protects against cytomegalovirus(CMV) disease and mortality in immunocompromised guinea pigs. **Antivir. Res.** v.65, n. 1, p. 35-43, Jan 2005.

SCIABICA, K.S.; DAI, Q.J.; SANDRI-GOLDIN, R.M. ICP27 interacts with SRPK1 to mediate HSV splicing by altering SR protein phosphorylation. **EMBO J.** v. 22, n. 7, p. 1608-1619, Apr 2003.

SHUKUROV, S.S.; KUKANIEV, M.A.; NASYROV, I.M.; ZAKHAROV, K.S.; KARAKHANOV, R.A. Electrophilic substitution in 2-bromo-7-methyl-5H—1,3,4-thiadiazol [3,2 -a]pyrimidin-5-one. **Russian J. Gen. Chem.** v. 63, p. 1610-1612, 1993.

SHUKLA D.; SPEAR P.G. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. **J. Clin. Invest.** v. 108, n. 4, p. 503-510, Aug 2001.

SHUKLA, D.; LIU, J.; BLAIKLOCK, P.; SHWORAK, N.W.; BAI, X.; ESKO, J.D.; COHEN, G.H.; EISENBERG, R.J.; ROSENBERG, R.D.; SPEAR, P.G. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. **Cell.** v. 99, n. 1, p.13-22, Oct 1999.

SIDWELL R.W.; BARNARD, D.L. Respiratory syncytial virus infections: recent prospects for control. **Antivir. Res.** v. 71, n. 2, p.379-390, Sep 2006.

SILVA, L.E **Heterociclos Aromáticos Nitrogenados** – Síntese e Potencial Quimioterápico. 2006. 189 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemática, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

SILVA, L. E.; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; Nunes, R. J.; SIMÕES, C. M. O.; FORO, S. Quinolin-8-yl 2,5dichlorobenzenesulfonate. **Acta Cryst.** Section E, v. 62, p. 2104 - 2105, 2006.

SILVERMAN, R.B. **The organic chemistry of drug design and drug action**, San Diego: Academic, 1992. 422 p.

SIMÕES, C.M.O.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. **Phytoth. Res.** v. 21, n. 4, p. 317-325, Jun 1999.

SJOGREN-JANSSON E.; JEANSSON, S. Large-scale production of monoclonal antibodies in dialysis tubing. **J. Immunol. Methods.** v. 84, n. 1-2, p.359-64, Nov 1985.

SJOGREN-JANSSON E.; JEANSSON S. Growing hybridomas in Dialysis Tubing: Optimization of the technique. In: ZOLA, H. (ed.), **Laboratory Methods in Immunology**, v. 1, Boca Raton: CRC press. Inc., p. 41-50, 1990.

SMITH, R.W.P.; MALIK P.; CLEMENTS. J.B. The herpes simplex virus ICP27 protein: a multifunctional post-transcriptional regulator of gene expression. **Biochem. Soc. Trans.** v. 33, n. Pt 3, p. 499-501, Jun 2005.

SOUZA, T.M.; DE SOUZA, M.C.; FERREIRA, V.F.; CANUTO, C.V.; MARQUES, I.P.; FONTES, C.F.; FRUGULHETTI, I.C. The chloroquinolinic derivative 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-(beta-D-ribofuranosyl) quinoline-3-carboxylic acid inhibits HSV-1 adsorption by impairing its adsorption on HVEM. **Arch. Virol.** v. 152, n. 7, p. 1417-1424, 2007.

SOUZA, T.M.; DE SOUZA, M.C.; FERREIRA, V.F.; CANUTO, C.V.; MARQUES, I.P.; FONTES, C.F.; FRUGULHETTI, I.C. Inhibition of HSV-1 replication and HSV DNA polymerase by the chloroquinolinic ribonucleoside 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-(beta-D-ribofuranosyl)quinoline-3-carboxylic acid and its aglycone. **Antivir. Res.** v. 77, n. 1, p. 20-27, Jan 2008.

SPANDIDOS, D. A.; GRAHAM, A. F. Infectious Center Assay for Complementation and Recombination Between Mutants of Reovirus **J. Virol.** v. 18, n. 3, p. 1151-1154, Jun 1976.

SPEAR, P.G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cell. Microbiol.** v. 6, n. 5, p. 401-410, May 2004.

SUBBIAH PANDI, A.; VELMURUGAN, D.; SHANMUGA SUNDARA RAJ, S.; FUN, H.-K.; BANSAL, M. C. **Acta Cryst. C.** v. 59, p. 0302-0304, 2003.

SUPURAN, C.T.; SCOZZAFAVA, A.; CASINI, A. Carbonic anhydrase inhibitors. **Med. Res. Rev.** v. 23, n. 2, 146-189, Mar 2003.

SUPURAN, C.T.; CASINI, A.; SCOZZAFAVA, A. Protease inhibitors of the sulfonamide type: anticancer, antiinflammatory, and antiviral agents. **Med. Res. Rev.** v. 23, n. 5, p. 535-558. Sep 2003.

SURLERAUX, D. L. N. G.; TAHRI, A.; VERSCHUEREN, W. G.; PILLE, G. M. E. Design of HIV-1 protease inhibitors active on multidrug-resistant virus. **J. Med.**

Chem., v. 48, n. 6, p.1965-73. Mar 2005.

TAKAHASHI, K.; MATSUDA, M.; OHASHI, K.; TANIGUCHI, K.; NAKAGOMI, O.; ABE, Y.; MORI, S.; SATO, N.; OKUTANI, K. SHIGETA, S. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. **Antivir. Res.**, v. 49, n. 1, p. 15-24, Jan 2001.

TAKESHIMA, H. Antiviral agents In: OMURA, S. **The search for bioactive compounds from microorganisms**. New York: Sprienger-Verlag Series, 1992. p. 50.

THI, T.N.; DEBACK, C.; MALET, I.; BONNAFOUS, P.; AIT-ARKOUB, Z.; AGUT, H. **Antivir. Res.** v. 69, n. 3, p. 152-157, Mar 2006.

THOMAS, G. **Química medicinal**: uma introdução. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 413 p.

THOMSEN, D.R.; OIEN, N.L.; HOPKINS, T.A.; KNECHTEL, M.L.; BRIDEAU, R.J.; WATHEN, M.W.; HOMA, F.L. Amino acid changes within conserved region III of the herpes simplex virus and human cytomegalovirus DNA polymerases confer resistance to 4-oxo-dihydroquinolines, a novel class of herpesvirus antiviral agents. **J. Virol.** v.77, n. 3, p.1868-1876, Feb 2003.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

TRYBALA, E.; SVENNERHOLM, B.; BERGSTRÖM, T.; OLOFSSON, S.; JEANSSON, S.; GOODMAN, J.L. Herpes simplex virus type 1-induced hemagglutination: glycoprotein C mediates virus binding to erythrocyte surface heparan sulfate. **Virol.** v. 67, n. 3, p. 1278-1285, Mar 1993.

TRYBALA E.; LILJEQVIST J.A.; SVENNERHOLM B.; BERGSTROM T. Herpes simplex virus types 1 and 2 differ in their interaction with heparin sulfate. **J. Virol.** v. 74, n. 19, p. 9106-9114, Oct 2000.

TRYBALA, E.; ROTH, A.; JOHANSSON, M.; LILJEQVIST, J.A.; REKABDAR, E.; LARM, O.; BERGSTRÖM, T. Glycosaminoglycan-binding ability is a feature of wild-type strains of herpes simplex virus type 1. **Virol.** v. 302, n. 2, p. 413-419 Oct 2002.

UCHIUMI, F.; HATANO, T.; ITO, H.; YOSHIDA, T.; TANUMA, S. Transcriptional suppression of the HIV promoter by natural compounds. **Antivir. Res.** v. 58, n. 1, p. 89-98, Mar 2003.

VAHERI, A. Heparin and related polyionic substances as virus inhibitors. **Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.** v. 171, n. 5, p.1-98. May 1964.

VAILLANCOURT, V.A.; CUDAHY, M.M.; STALEY, S.A.; BRIDEAU, R.J., CONRAD, S.J.; KNECHTEL, M.L.; OIEN, N.L. Naphthalene carboxamides as inhibitors of human cytomegalovirus DNA polymerase. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 18, n. 18, p. 2079-2081. Sep 2000.

VARELLA, R. B.; PIRES, I. L.; SARAIVA, C. A.; GUIMARÃES, A. C. C.; GUIMARÃES, M. A. A. M. Laboratorial diagnosis of herpes simplex virus infection (HSV) in transplanted and non-transplanted patients. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 41, n. 4, p. 257-262, Aug 2005.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Quím. Nova**, v. 28, p.95-102, 2005.

VINOKUROVA, N.M.; FELDMAN, I. Synthesis and properties of some sulfonamides of the quinoline series. **Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal** v. 2, p. 34-36, 1968.

VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D.A. Leads for antivirals from traditional medicines. In: PREBDERGASTM, H.D.V.; ETKIN, N.L.; HARRIS, D.R.; HOUGHTON, P.J. (Ed.). **Plants for Food and Medicine**. London: Royal Botanic Gardens, 1998. p.333-344.

VISALLI, R.J.; VAN ZEIJL, M. DNA encapsidation as a target for anti-herpesvirus drug therapy. **Antivir. Res.** v.59, n. 2, p.73-87, Jul 2003.

VRANJAC, A. Diarréia e rotavírus. **Rev. Saúde Pública**, v. 38, n. 6, p.844-845, Dec 2004.

VOGEL, A. I.; FURNISS, B. S. **Vogel's textbook of practical organic chemistry**. 5th. / rev. by FURNISS, B.S. HANNAFORE, A.J.; SMITH, P.W.; TATCHELL, A.R. New York: Longmann Scientific & Technical, 1989. 1514p.

VOYLES, B.A. **The biology of viruses**. St Louis: Mosby-Year Book, 1993. p. 386.

WALTER, M.E.; MORA, C.; MUNDSTOCK, K.; DE SOUZA, M.M.; DE OLIVEIRA PINHEIRO, A.; YUNES, R.A.; NUNES, R.J. Antinociceptive properties of chloromaleinimides and their sulphonyl derivatives. **Arch. Pharm. (Weinheim)**. v. 337, n. 4, p.201-206, Apr 2004.

WEBER, P.C. Small Molecule Inhibitors of Herpes Simplex Virus Type 1 Immediate Early Gene Expression. **Drug News Perspect.** V. 15, p. 299-305, 2002.

WHITE, D.O.; FENNER, F.J. **Medical Virology**. 4th. ed., San Diego: Academic, 1994. 603 p.

WHITLEY, R.J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **Lancet** v. 357, n. 9267, p. 1513-1518, May 2001. Bottom of Form

WIEDBRAUK, D. L.; SHERYL, L.G.J. **Manual of clinical virology**. New York: Rave, 1992. 275 p.

WINUM, J.Y.; SCOZZAFAVA, A.; MONTERO, J.L.; SUPURAN, C.T. Therapeutic potential of sulfamides as enzyme inhibitors. **Med. Res. Rev.** v. 26, n. 6, p. 767-792, Nov 2006.

WITVROUW, M.; DE CLERCQ, E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. **Gen. Pharmacol.** v. 29, n. 4, p. 497-511, Oct 1997.

WU, J.H.; WANG, X.H.; YI, Y.H.; LEE, K.H. Anti-AIDS agents 54. A potent anti-HIV chalcone and flavonoids from genus *Desmos*. **Bioorg. Med. Chem Lett.** v.13, n. 10, p.1813-1815, May 2003.

WUDUN, D.; SPEAR, P.G. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. **J Virol.** v. 63, n. 1, p. 52-58, Jan 1989.

WYDE, P.R.; LAQUERRE, S.; CHETTY, S.N.; GILBERT, B.E.; NITZ, T.J.; PEVEAR, DC. Antiviral efficacy of VP14637 against respiratory syncytial virus in vitro and in cotton rats following delivery by small droplet aerosol. **Antivir. Res.** v. 68, n. 1, p. 18-26, Oct 2005.

YASIN, S.R.; AL-NAKIB, W.; TYRRELL, D.A. Pathogenicity for humans of human rhinovirus type 2 mutants resistant to or dependent on chalcone Ro 09-0410. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 34, n. 6, p. 963-6. Jun 1990.

YANG, G.F.; HUANG, X. Development of quantitative structure-activity relationships and its application in rational drug design. **Curr. Pharm. Des.** v. 12, n. 35, p. 4601-11, 2006.

YE, C.L.; LIU, J.W.; WEI, D.Z.; LU, Y.H.; QIAN, F. In vitro anti-tumor activity of 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone against six established human cancer cell lines. **Pharmacol. Res.** v. 50, n. 5, p. 505-510, Nov 2004.

YU, K.L.; WANG, X.A.; CIVIELLO, R.L.; TREHAN, A.K.; PEARCE, B.C.; YIN, Z.; COMBRINK, K.D.; GULGEZE, H.B.; ZHANG, Y.; KADOW, K.F.; CIANCI, C.W.; CLARKE, J.; GENOVESI, E.V.; MEDINA, I.; LAMB, L.; WYDE, P.R.; KRYSTAL, M.; MEANWELL, N.A. Respiratory syncytial virus fusion inhibitors. Part 3: Water-soluble benzimidazol-2-one derivatives with antiviral activity in vivo. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 16, n. 5, p. 1115-1122, Mar 2006.

XU, Z.; KUANG, M.; OKICKI, J.R.; CRAMER, H.; CHAUDHARY, N. Potent inhibition of respiratory syncytial virus by combination treatment with 2-5A antisense and ribavirin. **Antivir. Res.** v. 61, n. 3, p. 195-206, Mar 2004.

ZACHAROPOULOS, V.R.; PHILLIPS D.M., Vaginal formulations of carrageenan protect mice from herpes simplex virus infection. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v. 4, n. 4, p. 465-468, Jul 1997.

ZHANG, M., CHEUNG, P.C., OOI, V.E., ZHANG, L. Evaluation of sulfated fungal beta-glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a potential water-soluble anti-viral agent. **Carbohydr. Res.** v. 339, n. 13, p. 2297-2301, Sep 2004.

ZHU, W.; CHIU, L.C.; OOI, V.E.; CHAN, P.K.; ANG, P.O. JR. Antiviral property and mechanisms of a sulphated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens*

against Herpes simplex virus type 1. **Phytomedicine**. v.13, n. 9-10, p. 695-701, Nov 2006.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.(Org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade; Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. p. 578-614.

APÊNDICE 1

Artigos publicados

1. ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; SILVA, L. E.; NUNES, R. J.; SIMÕES, C. M. O.; FORO, S. N-Benzylquinoline-8-sulfonamide. **Acta Cryst.** Section E, v.E62, p. 03693-03694, 2006.
2. SILVA, L. E.; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; NUNES, R. J.; SIMÕES, C. M. O.; FORO, S. Quinolin-8-yl 2,5dichlorobenzenesulfonate. **Acta Cryst.** Section E, v. 62, p. 2104 -2105, 2006.
3. ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; JOUSSEF, A. C.; SIMÕES, C. M. O.; NUNES R. J.; BORTOLUZZI, A. J. 5-(2-Benzoylphenyl)-N-benzyl-2 methoxybenzenesulfonamide. **Acta Cryst.** Section E, v. 63, p. 03275-03276, 2007a.
4. ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; SILVA, L. E.; SIMÕES, C. M. O.; NUNES, R. J.; FORO, S. N-(4-Methoxybenzyl)quinoline-8-sulfonamide. **Acta Cryst.** Section E, v. 63, p. 03059-03060, 2007b.
5. ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; SILVA, L. E.; SIMÕES, C. M. O.; NUNES, R. J.; FORO, S. 8-(Piperidin-1-ylsulfonyl)quinoline. **Acta Cryst.** Section E, v. 63, p.01638-01639, 2007c.
6. ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; DE OLIVEIRA, K.N.; GASPAR-SILVA, D.; PACHECO, L.K.; JOUSSEF, A.C.; STEINDEL, M.; SIMÕES, C.M.O; DE SOUZA, A.M.T.; MAGALHAES, U.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; NUNES, R.J.; CASTRO, H.C. Synthesis, Biological evaluation and SAR of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives with Potential Antileishmanial Activity. **Eur. J. Med. Chem.** 2008.

6 CONCLUSÕES

- As sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona e as sulfonamidas derivadas de quinolina foram sintetizadas e caracterizadas.
- As sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona apresentaram baixas porcentagens de inibição da replicação do rotavírus e do HSV-1 cepas KOS e 29R/resistente ao aciclovir.
- As sulfonamidas derivadas da quinolina apresentaram baixas porcentagens de inibição da replicação do vírus RSV cepa A2, enquanto que, as sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona foram citotóxicas para as células HEp-2 nas concentrações de 100, 50 e 25 μ M.
- As sulfonamidas derivadas da 4-metoxichalcona (**25**), (**28**) e (**29**), e as sulfonamidas derivadas de quinolina (**39**), (**40**) e (**42**) apresentaram baixos índices de seletividade para o HSV-2.
- Nos estudos da atividade antiviral das sulfonamidas derivadas de chalcona e sulfonamidas derivadas de quinolina as baixas porcentagens de inibição da replicação viral e os baixos índices de seletividade verificados indicam que as moléculas sintetizadas não são promissoras na pesquisa de novos fármacos com atividade antiviral frente aos vírus testados.
- Nos processos de triagem realizados, o composto (**98**) (2,2-dimetil-5-[(1,3,4-tiadiazol-2-amino)metileno]-1,3-dioxane-4,6-dione), uma celohexaose sulfatada (**167**) e um oligossacarídeo formado por duas unidades de lactose sulfatadas ligadas por um espaçador hidrofóbico específico do tipo C_6H_4 (**183**) apresentaram atividades antivirais promissoras.

Quanto ao composto (**98**) pode-se concluir que:

- Apresenta perfil promissor na inibição da replicação do vírus HSV-1 cepa 29R/resistente ao aciclovir, além de baixa atividade anti-RSV, e inibição de apenas 37% da replicação do HSV-2 cepa 333.
- A mudança do núcleo 1,3,4-tiadiazol por outros núcleos estruturalmente relacionados, tais como triazol, tiazole, bromotiazol, tiazolino e metiltiazol, levou a uma perda da atividade antiviral em relação ao HSV-1 cepa 29R. A presença de substituintes hidrofílicos ou lipofílicos no carbono 5 do núcleo

tiadiazólico, também levou a uma acentuada diminuição da atividade antiviral.

- O núcleo 1,3,4-tiadiazol é um possível grupo farmacofórico, isto é, a subunidade estrutural do composto (**98**) que seria responsável pela inibição da replicação do vírus HSV-1 cepa 29R.
- Não apresenta ação virucida sobre os vírus HSV-1 cepa 29R/resistente ao aciclovir, HSV-2 cepa 333 e RSV cepa A2.
- É capaz de inibir a replicação do HSV-1 cepa 29R/resistente ao aciclovir quando adicionado nas primeiras 3h pós-infecção.
- Apresenta atividade inibitória sobre a síntese da proteína α ICP27 e pequena supressão das proteínas γ , gB, gD e gE.
- Reduz a área das placas de lise formadas pelo HSV-1 cepa 29, sugerindo ter um potencial de interferir com a atividade de dispersão do HSV célula a célula.
- Não interfere na síntese do DNA viral.
- O mecanismo de ação anti-HSV-1 do composto, parece ser mediado em parte, pela inibição da dispersão célula a célula do HSV-1 cepa 29R e pela interferência em eventos imediatos de replicação deste vírus, através do bloqueio da síntese da proteína α ICP 27.

Com relação aos compostos (**167**) e (**183**) conclui-se que:

- Apresentam atividades anti-RSV e anti-HSV-1 e anti-HSV-2 promissoras, não demonstrando efeitos tóxicos sobre as células utilizadas.
- Não apresentam ação virucida sobre os vírus HSV-1 KOS 321, HSV-2 cepa 333 e RSV cepa A2.
- Reduzem a atividade de dispersão célula a célula do vírus HSV e em alguma extensão do RSV.
- Inibem a adsorção dos vírions purificados do HSV e do RSV às células, assim como, diminuem a capacidade de ligação das glicoproteínas de adsorção purificadas gB e gC do HSV-1 ou do HSV-2 às células GMK AH1.
- A presença de variantes resistentes aos compostos (**167**) e (**183**) nas cepas gC-negativas do HSV-1 sugere que, com exceção da gC, outro (s) componente (s) viral (s) poderiam ser alvo destes compostos durante o curso da infecção viral das células.

- Muitas das variantes do HSV-1 foram mais resistentes quando na presença do inibidor durante a dispersão dos vírus célula a célula do que na presença do inibidor durante a infecção inicial das células.
- O mecanismo de atividade antiviral dos compostos oligossacarídeos sulfatados **167** e **183** parece ser mediada pela inibição da dispersão viral célula a célula do HSV e pela interferência na ligação dos vírus às células glicosaminoglicanas das superfícies celulares. Os resultados indicaram, ainda, que outro(s) componente(s) viral(is), exceto a glicoproteína gC, poderia(m) estar também envolvidos(s) na atividade anti-HSV-1 detectada.

REFERÊNCIAS

ADAMIAK, B.; EKBLAD, M.; BERGSTRÖM, T.; FERRO, V.; TRYBALA, E. Herpes simplex virus type 2 glycoprotein G is targeted by the sulfated oligo- and polysaccharide inhibitors of virus attachment to cells. **J. Virol.** v. 81, n. 2, p.13424-13434, Dec. 2007.

AGUILAR, J.S.; RICE M.; WAGNER, E.K. The polysulfonated compound suramin blocks adsorption and lateral diffusion of herpes simplex virus type-1 in vero cells. **Virol.** v. 258, n.1, p. 141-51, May 1999.

AHMAD, A.L.; TYRRELL, D.A. Synergism between anti-rhinovirus antivirals: various human interferons and a number of synthetic compounds. **Antivir. Res.** v. 6, n. 4, p. 241-252, Jul 1986.

ALLAIN, J. P.; LAURIAN, Y.; PAUL, D. A.; SENN, D. Serological marker in early stages of human immunodeficiency virus infection in haemophiliacs. **Lancet** v. 2, n. 8518, p. 1233-1236, Nov 1986.

ALMELA, M.J.; GONZALEZ, M.E.; CARRASCO, L. Inhibitors of poliovirus uncoating efficiently block the early membrane permeabilization induced by virus particles. **J. Virol.** v. 65, n. 5, p. 2572-2577, May 1991.

AL-NAKIB, W.; HIGGINS, P.G.; BARROW, I.; TYRRELL, D.A.; LENOX-SMITH, I.; ISHITSUKA, H. Intranasal chalcone, Ro 09-0410, as prophylaxis against rhinovirus infection in human volunteers. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 20, n. 6, p. 887-892, Dec 1987.

AMARAL, A.T.; MONTANARI, C.A. Química Medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. **Quím. Nova**, v. 25, p. 39-44, 2002.

ANDRADE, E. da S. **Síntese, caracterização, atividades biológicas, estudo de modelagem molecular e correlação estrutura-atividade de benzenossulfonilaziridinas.** 2004. 212 f. Tese (Doutorado em Química) – Program de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2004.

ANDRICOPULO A.D.; MONTANARI C.A. Structure-activity relationships for the design of small-molecule inhibitors. **Mini. Rev. Med. Chem.** v. 5, n. 6, p. 585-93, Jun 2005.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; SILVA, L.E.; Nunes, R. J.; SIMÕES, C.M.O.; FORO, S. N-Benzylquinoline-8-sulfonamide. **Acta Cryst.** Section E, v. 62, p. 03693 - 03694, 2006.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; JOUSSEF, A.C.; SIMÕES, C.M.O.; NUNES R.J.; BORTOLUZZI, A. J. 5-(2-Benzoylphenyl)-N-benzyl-2 methoxybenzenesulfonamide. **Acta Cryst.** Section E., v. 63, p. 03275 - 03276, 2007a.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; SILVA, L.E.; SIMÕES, C.M.O.; NUNES, R.J.; FORO, S. N-(4-Methoxybenzyl)quinoline-8-sulfonamide. **Acta Cryst.** Section E, v. 63, p. 03059-03060, 2007b.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; SILVA, L.E.; SIMÕES, C.M.O.; NUNES, R.J.; FORO, S. 8-(Piperidin-1-ylsulfonyl)quinoline. **Acta Cryst.** Section E, v. 63, p.01638-01639, 2007c.

ARDUINO, P.G.; PORTER, S.R. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. **J. Oral Pathol. Med.** v. 37, n. 2, p. 107-121, Feb 2008.

BABA, M.; SNOECK, R.; PAUWELS, R.; DE CLERCQ, E. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. **Antimicrob. Agents Chemother** v. 32, n. 11, p. 1742-5, Nov 1988.

BAIRD, J.K. Effectiveness of antimalarial drugs. **N. Engl. J. Med.** v. 14, n. 15, p.1565-1577, Apr 2005.

BARARDI, C.R.M.; EMSLIE, K.R; VESEY, G.; WILLIAMS, K.L. Development of a rapid and sensitive quantitative assay for rotavirus based on flow cytometry. **J. Virol. Methods** v. 74, n. 1, p. 31-37, Set 1998.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química medicinal:** as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: Artemed, 2002. 243p.

BASSIN, J.P.; CREMLYN, R.J.; SWINBOURNE, F.J. Chlorosulfonation of aromatic and heteroaromatic systems. **Phosph. Sulfur** v. 56, p. 24-275, 1991.

BAUMEISTER, J.; FISCHER, R.; ECKENBERG, P.; HENNINGER, K.; RUEBSAMEN-WAIGMANN, H. KLEYMANN, G. Superior efficacy of helicase-primase inhibitor BAY 57-1293 for herpes infection and latency in the guinea pig model of human genital herpes disease. **Antivir. Chem. Chemother** v. 18, n.1, p. 35-48, 2007.

BHATTACHARJEE, A.K.; NICHOLS, D.A.; GERENA, L.; RONCAL, N.; GUTTERIDGE, C.E. An in silico 3D pharmacophore model of chalcones useful in the design of novel antimalarial agents. **Med. Chem.** v. 3, n. 4, p. 317-326, Jul 2007.

BERGEFALL, K. **Interaction of Herpes Simplex Virus with cell surface glycosaminoglycans as a target for antiviral intervention.** 2005. 54 p. Thesis (Doctor of Philosophy in Microbiology) – Department of Clinical Virology, Göteborg University, Goteborg, 2005.

BETZ, G.; NOWBAKHT, P.; IMBODEN, R.; IMANIDIS, G. Heparin penetration into and permeation through human skin from aqueous and liposomal formulations in vitro. **Int. J. Pharm.** v. 228, n. 1-2, p. 147-159, Oct 2001.

BETZ, U.A.; FISCHER, R.; KLEYMANN, G.; HENDRIX, M.; RUEBSAMEN-

WAGMANN, H. Potent in vivo antiviral activity of the herpes simplex virus primase-helicase inhibitor BAY 57-1293. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 46, n. 6, p. 1766-72, Jun 2002.

BONE, R.; SALEMME, R. The integration of structure-based design and directed combinatorial chemistry for new pharmaceutical discovery. In: VEERAPANDIAN, P. (Ed.) **Structure-based drug design**. New York; Marcel Dekker, 1997. p. 525-539.

BONINA, L.; ORZALES, G.; MERENDINO, R.; ARENA, A.; MASTROENI, P. Structure-activity relationships of new antiviral compounds. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 22, n. 6, p. 1067-1069, Dec 1982.

BOULWARE, S.L.; BRONSTEIN, J.C.; NORDBY, E.C.; WEBER, P.C. Identification and characterization of a benzothiophene inhibitor of herpes simplex virus type 1 replication which acts at the immediate early stage of infection. **Antivir. Res.** v. 51, n. 2, p. 111-125, Aug 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADY, R.C.; BERNSTEIN, D.I. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antivir. Res.** v. 61, n. 2, p. 73-81, Feb 2004.

BRIDEAU, R.J.; KNECHTEL, M.L.; HUANG, A.; VAILLANCOURT, V.A.; VERA, E.E.; OIEN, N.L.; HOPKINS, T.A.; WIEBER, J.L.; WILKINSON, K.F.; RUSH, B.D.; SCHWENDE, F.J.; WATHEN, M.W. Broad-spectrum antiviral activity of PNU-183792, a 4-oxo-dihydroquinoline, against human and animal herpesviruses. **Antivir. Res.** v. 54, n. 1, p. 19-28, Apr 2002.

BRUNO, I. J.; COLE, J. C.; KESSLER, M.; LUO, J.; MOTHERWELL, W. D. S.; PURKIS, L. H.; SMITH, B. R.; TAYLOR, R.; COOPER, R. I.; HARRIS, S. E.; ORPEN, A. G. Retrieval of Crystallographically-Derived Molecular Geometry Information. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.** v. 44, n. 6, p. 2133-2144, Dec 2004.

BUCHMANN, G.; SCHALINATUS, E.. 8-Quinolinesulfonyl chloride as starting material for quinolylsulfonamides. **J. Praktische Chemie** v. 16, p. 152-165, 1962.

BURLESON, F.G.; CHAMBERS, T.M.; WIEDBRAUK, D.L. **Virology**: a laboratory manual. San Diego: Academic, 1992. 250 p.

CABRERA, M.; SIMOENS, M.; FALCHI, G.; LAVAGGI, M.L.; PIRO, O.E.; CASTELLANO, E.E.; VIDAL, A.; AZQUETA, A.; MONGE, A.; DE CERÁIN, A.L.; SAGRERA, G.; SEOANE, G.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: biological evaluation and structure-activity relationships. **Bioorg. Med. Chem.** v. 15, n. 15, p. 3356-3367, May 2007.

CARLUCCI M.J.; CIANCIA M.; MATULEWICZ M.C.; CEREZO A.S.; DAMONTE E.B. Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. **Antivir. Res.** v. 43, n. 2, p. 93-102, Sep 1999.

CARLUCCI, M.J.; SCOLARO, L.A.; DAMONTE, E.B. Herpes simplex virus type 1 variants arising after selection with an antiviral carrageenan: lack of correlation between drug susceptibility and syn phenotype. **J. Med. Virol.** v. 68, n. 1, p.92-98, Sep 2002.

CASSADY, K.A., WHITLEY, R.J. New therapeutic approaches to the alphaherpesvirus infections. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 39, n. 2, 119-28, Feb 1997.

CECHINEL FILHO, V.; DE CAMPOS, F.; CORRÊA, R.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. **Quím. Nova**, v. 26, n. 2, p. 230-241, 2003.

CESARIN-SOBRINHO, D.; NETTO-FERREIRA, J. C.; BRAZ-FILHO, R. Efeito da substituição por átomos de flúor no equilíbrio conformacional de chalcona. **Quím. Nova** v. 24, p.604-611, 2001.

CHESHENKO, N.; HEROLD, B.C. Glycoprotein B plays a predominant role in mediating herpes simplex virus type 2 attachment and is required for entry and cell-to-cell spread. **J. Gen. Virol.** v. 83, n. 9, p. 2247-2255, Sep 2002.

CHESHENKO, N.; KELLER, M.J.; MASCASULLO, V.; JARVIS, G.A.; CHENG, H.; JOHN, M.; LI, J.H.; HOGARTY, K.; ANDERSON, R.A.; WALLER, D.P.; ZANEVELD, L.J.; PROFY, A.T.; KLOTMAN, M.E.; HEROLD, B.C. Candidate topical microbicides bind herpes simplex virus glycoprotein B and prevent viral entry and cell-to-cell spread. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 48, n. 6, p. 2025-2036, Jun 2004.

CHIBALE, K.; MUSONDA, C.C. The synthesis of parasitic cysteine protease and trypanothione reductase inhibitors. **Curr. Med. Chem.** v. 10, n. 18, p. 1863-1889 Sep 2003.

COLBERE, F. L'herpèsvirus simplex: structure, replication et biologie. **B. I. Pasteur.** v. 73, p. 203-254, 1975.

CORRÊA, R. **Síntese de compostos imídicos cíclicos de interesse biológico.** 1997. 166 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1997.

COSTELLO, M.; SABATINI, L.; YUNGBLUTH, P. Herpes Simplex Virus Infections and Current Methods for Laboratory Detection. **Clin. Microbiol. Newsletter** v. 28, n. 24, p. 185-192, Dec 2006.

CREMLYN, J. R.; SWINBOURNE, F.J.; YUNG, K-M. Some Heterocyclic Sulfonyl chlorides and Derivatives. **J. Heterocyclic. Chem.** v. 18, p. 997-1006, 1980.

CREMLYN, J. R.; SWINBOURNE, F.J.; SHODE, O.O. Some reactions of chalcone-4-

sulfonyl chloride and 4-methoxychalcone-3-sulfonyl chloride. **J. Chin. Chem. Soc.** v. 31, p. 383-390, 1984.

CREMLYN, R.J.; SWINBOURNE, F.J.; BASSIN, P.; DANE, D.; HIGGINS, K.; MITCHELL, P.; CAVALEIRO, J. A. S.; DOMINGUES, F. J.; DIAS, M. Sulfonyl chalcones. **Phosphorus Sulfur** v. 63, p. 385-395, 1991.

DA SILVA, A.G. Propriedades gerais dos herpesvirus. In: LUPI, O.; DA SILVA, A.G.; PEREIRA JR, A.C. (Org.). **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**, p. 1-14, Rio de Janeiro: Medsi, 2000.

DAI-JU, J.Q.; LI, L.; JOHNSON, L.A.; SANDRI-GOLDIN, R.M. ICP27 interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II and facilitates its recruitment to herpes simplex virus 1 transcription sites, where it undergoes proteasomal degradation during infection **J. Virol.** v. 80, n. 7, p. 3567-3581, Apr 2006.

DE CLERCQ, E. New inhibitors of human cytomegalovirus (HCMV) on the horizon. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.51, p.1079-1083, 2003.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. **J. Clin. Virol.**, v. 30, n. 2, p.115-33, Jun 2004a.

DE CLERCQ, E. Antivirals and antiviral strategies. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 704-720, 2004b.

DE OLIVEIRA, K.N. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade biológica de sulfonamidas e sulfonilhidrazonas**. 2004. 126 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2004.

DE TOMMASI, N.; PIZZA, C.; AQUINO, R.; CUMANDA, J.; MAHMOOD, N. Flavonol and chalcone ester glycosides from *Bidens leucantha*. **J. Nat. Prod.** v. 60, n. 3, p. 270-273, Mar 1997.

DELFIN, D.A.; BHATTACHARJEE, A.K.; YAKOVICH, A.J.; WERBOVETZ, K.A. Activity of and initial mechanistic studies on a novel antileishmanial agent identified through in silico pharmacophore development and database searching. **J. Med. Chem.** v. 13, n. 49, p. 4196-4207, Jul 2006.

DIETERLE, W.; MANN, J.; KUTZ, K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the ETA-selective endothelin receptor antagonist SPP301 in healthy human subjects. **J. Clin. Pharmacol.** v.44, n. 1, p.59-66, Jan 2004.

DIMMOCK, J.R.; ELIAS, D.W.; BEAZELY, M.A.; KANDEPU, N.M. Bioactivities of chalcones. **Curr. Med. Chem.** v. 6, n. 12, p.1125-49, Dec 1999.

DREW J. Drug discovery: a historical perspective. **Science**. v. 287, p. 1960-1964, 2000.

DUFF, R.; RAPP, F. Oncogenic transformation of hamster cells after exposure to

herpes simplex virus type 2. **Nature New Biol.** v. 233, n. 36, p. 48-50, Sep 1971.

EBBERT J.O.; LIMPER A.H. Respiratory syncytial virus pneumonitis in immunocompromised adults: clinical features and outcome. **Respiration** v. 72, n. 3, p. 263-269, May-Jun 2005.

EKBLAD, M.; ADAMIAK, B.; BERGEFALL, K.; NENONEN, H.; ROTH, A.; BERGSTROM, T.; FERRO, V.; TRYBALA, E. Molecular basis for resistance of herpes simplex virus type 1 mutants to the sulfated oligosaccharide inhibitor PI-88. **Viol.** v. 367, n. 2, p. 244-252, Oct 2007.

EKBLAD, M.; BERGSTRÖM, T.; BANWELL, M.G.; BONNET, M.; RENNER, J.; FERRO, V.; TRYBALA, E. Anti-herpes simplex virus activities of two novel disulphated cyclitols. **Antivir. Chem. Chemother.** v. 17, n. 2, p. 97-106, 2006.

EKBLAD, M. **Anti-herpes simplex virus activities of sulfomannan oligosaccharide PI-88 and disulfated cyclitols.** 2007. 44 p. Thesis (Doctor of Philosophy in Microbiology) – Department of Clinical Virology, Göteborg University, Goteborg, 2007.

ELLISON, K. S.; MARANCHUK, R. A.; MOTTET, K. L.; SMILEY, J. R. Control of VP16 translation by the herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP27. **J. Virol.** v. 79, n. 7, p. 4120-4131, Apr 2005.

FARHAT, C.K.; CINTRA, A.L.; TREGNAGHI, M.W. Vacinas e o trato respiratório – o que devemos saber? **J. Pediatr.** v. 78, n. 2, p. 195-204, nov./dez. 2002.

FEYZI, E., TRYBALA, E., BERGSTROM, T., LINDAHL, U., SPILLMANN, D. Structural requirement of heparan sulfate for interaction with herpes simplex virus type 1 virions and isolated glycoprotein C. **J. Biol. Chem.** v. 272, n. 40, p. 24850-24857, Oct 1997.

FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MALCOLM, A.M.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (eds.) **Fields Virology.** 4th ed. v. 1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

FLINT, S.J.; ENQUIST, L.W.; KRUG, R.M.; RACANIELLO, V.R.; SKALKA, A.M. **Principles of virology:** molecular, biology, pathogenesis and control. Washington: ASM, 2000. p. 662-714.

FLASEY, A.R., WALSH, E.E. Respiratory syncytial virus infection in adults. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 13, p. 371–384, 2000.

FALSEY, A.R.; WALSH, E.E., Viral pneumonia in older adults. **Clin. Infect. Dis.** v. 15, p. 518–524, Jan 2006.

GABER, A.EA. M.; McNAB, H. Synthetic applications of the pyrolysis of Meldrum's Acid derivatives. **Synthesis.** v. 14, p. 2059-2074, 2001.

GILGER, M.A.; MATSON, D.O.; CONNER, M.E.; ROSENBLANTT, H.M.;

FINEGOLD, M.J.; ESTES, M.K. Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. **The J. of Pediatr.** v. 120, n. 6, p. 912-917, Jun 1992.

GIRAD, M.; HIRTH, L. **Virologie Moléculaire**. 2ème. ed. Paris: Doin, 1989. 617 p.

GO, M.L.; LIU, M.; WILAIRAT, P.; ROSENTHAL, P.J.; SALIBA, K.J.; KIRK, K. Antiplasmodial chalcones inhibit sorbitol-induced hemolysis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 48, n. 9, p. 3241-3245, Sep 2004.

GO, M.L.; WU, X.; LIU, X.L. Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. **Curr. Med. Chem.** v.12, n. 4, p. 481-99, 2005.

GRECO, A.; DIAZ, J.J.; THOUVENOT, D.; MORFIN, F. Novel targets for the development of anti-herpes compounds. **Infect. Disord. Drug Targets.** v. 7, n. 1, p.11-18, Mar 2007.

GUNALP, A. Growth and cytopathic effect of rubella virus in a line of green monkey kidney cells. **Proc. Soc. Exp. Biol.** v. 118, p. 185-190, 1965.

GUPTA, C.K., LESZCZYNSKI, J.; GUPTA, R.K., SIBER, G.R. Stabilization of respiratory syncytial virus (RSV) against thermal inactivation and freeze-thaw cycles for development and control of RSV vaccines and immune globulin. **Vaccine** v.14, n. 15, p. 1417-1420. Oct 1996.

GUPTA, R.; WARREN, T.; WALD, A. Genital herpes. **Lancet.** v. 22, n. 370, p. 2127-2137 Dec 2007.

HALLAK, L.K., COLLINS, P.L., KNUDSON, W., PEEPLES, M.E. Iduronic acid-containing glycosaminoglycans on target cells are required for efficient respiratory syncytial virus infection. **Viol.** v. 271, n. 2, p. 264-275, Jun 2000a.

HALLAK, L.K., SPILLMANN, D., COLLINS, P.L., PEEPLES, M.E., Glycosaminoglycan sulfation requirements for respiratory syncytial virus infection. **J. Virol.** v. 74, n. 22, p.10508-10513, Nov 2000b.

HARTER, W.G.; ALBRECT, H.; BRADY, K.; CAPRATHE, B.; DUNBAR, J.; The design and synthesis of sulfonamides as caspase-1 inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v.14, n. 3, p. 809-812, Feb 2004.

HARTLINE, C.B.; HARDEN, E.A.; WILLIAMS-AZIZ, S.L.; KUSHNER, N.L.; BRIDEAU, R.J.; KERN, E.R. Inhibition of herpesvirus replication by a series of 4-oxo-dihydroquinolines with viral polymerase activity. **Antivir. Res.** v. 65, n. 2, p.97-105, Feb 2005.

HATANO, T.; YASUHARA, T.; MIYAMOTO, K.; OKUDA, T. Anti-human immunodeficiency virus phenolics from licorice. **Chem. Pharm. Bull.** v. 36, n. 6, p. 2286-2288, Jun 1988.

HEROLD, B.C.; VISALLI, R.J.; SUSMARSKI, N.; BRANDT, C.R.; SPEAR, P.G. Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. **J. Gen. Virol.** v. 75, n. 6, p. 1211-1222, Jun 1994.

HEROLD, B.C.; GERBER, S.I.; BELVAL, B.J.; SISTON, A.M.; SHULMAN, N. Differences in the susceptibility of herpes simplex virus types 1 and 2 to modified heparin compounds suggest serotype differences in viral entry. **J. Virol.** v. 70, n. 6, p. 3461-3469, Jun 1996.

HOGGAN, M.D.; ROIZMAN, B. The isolation and properties of a variant of herpes simplex producing multinucleated giant cells in monolayer cultures in the presence of antibody. **Am. J. Hyg.** v.70, p. 208-219, Sep 1959.

HOLLAND, T.C.; MARLIN, S.D.; LEVINE, M.; GLORIOSO, J. Antigenic variants of herpes simplex virus selected with glycoprotein-specific monoclonal antibodies. **J. Virol.** v. 45, p. 672-682, 1983.

HOLLAND, T.C.; HOMMA, F.L.; MARLIN, S.D.; LEVINE, M.; GLORIOSO, J. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein C-negative mutants exhibit multiple phenotypes, including secretion of truncated glycoproteins. **J. Virol.** v. 52, p.566-574, 1984.

HSIEH, H.K.; TSAO, L.T.; WANG, J.P.; LIN, C.N. Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 52, n. 2, p.163-171, Feb 2000.

HERMOSO, A.; JIMENEZ, I.A.; MAMANI, Z.A.; BAZZOCCHI, I.L.; PINERO, J.E.; RAVELO, A.G.; VALLADARES, B. Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *piper elongatum* and synthetic related compounds: Structural requirements for activity. **Bioorg. Med. Chem.** v. 11, n. 18, p. 3975-80, Sep 2003.

HUANG X.; LIU Z. Solid-phase synthesis of 4(1H)-quinolone and pyrimidine derivatives based on a new scaffold-polymer-bound cyclic malonic acid ester. **J. Org. Chem.** v. 67, p. 6731-6737, 2002.

ISHITSUKA, H.; NINOMIYA, Y.T.; OHSAWA, C.; FUJII, M.; SUHARA, Y. Direct and specific inactivation of rhinovirus by chalcone Ro 09-0410. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 22, n. 4, p. 617-621, Oct 1982.

JEAN, S.; LEVAN, K. M.; SONG, B.; LEVINE, M.; KNIPE, D. M. Herpes simplex virus 1 ICP27 is required for transcription of two viral late (~2) genes in infected cells. **Virol.** v. 283, p. 273-284, 2001.

KANEKO, H.; KEIICHIRO, K.; MORI, S.; SHIGETA, S. Antiviral activity of NMSO3 against adenovirus *in vitro*. **Antivir. Res.**, v. 52, n. 3, p. 281-288, Dec 2001.

KAROLI, T.; LIU L.; FAIRWEATHER, J.K.; HAMMOND, E.; LI, C.P.; COCHRAN, S.; BERGEFALL, K.; TRYBALA, E.; ADDISON, R.S.; FERRO, V. Synthesis, biological activity, and preliminary pharmacokinetic evaluation of analogues of a

phosphosulfomannan angiogenesis inhibitor (PI-88). **J. Med. Chem.** v. 48, n. 26, p. 8229-8236, Dec 2005.

KARGER, A.; METTENLEITER, T.C., Glycoproteins gIII and gp50 play a dominant roles in the biphasic attachment of pseudorabies virus. **Virology**. v. 194, n. 2, p. 654:664, Jun 1993.

KAUFMAN, H.E.; VARNELL, E.D.; GEBHARDT, B.M.; THOMPSON, H.W.; ATWAL, E.; RÜBSAMEN-WAIGMANN, H.; KLEYMANN, G. Efficacy of a Helicase-Primase Inhibitor in Animal Models of Ocular Herpes Simplex Virus Type 1 Infection. **J. Ocul. Pharmacol. Ther.** Jan 2008 (*in press*).

KINCHINGTON, D.; KANGRO, H.; JEFFRIES, D. J. Design and testing of antiviral compounds. In: DESSELBERGER, U. (Ed.). **Medical Virology: a practical approach**. Oxford: University, 1995. p.147-171.

KLEYMANN, G. New antiviral drugs that target herpesvirus helicase primase enzymes. **Herpes**. v. 10, n. 2, p. 46-52, Aug 2003.

KECSKEMETI, V.; BAGI, Z.; PACHER, P.; POSA, I.; KOCSIS, E.; KOLTAI, M.Z. New trends in the development of oral antidiabetic drugs. **Curr. Med. Chem.** v. 9, n. 1, p. 53-71, Jan 2002.

KRATZ, J.M. **Estudo do mecanismo da ação anti-herpética do ácido gálico e do galato de pentila**. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

KROMANN, H.; LARSEN, M.; BOESEN, T.; SCHONNING, K.; NIELSEN, SF. Synthesis of prenylated benzaldehydes and their use in the synthesis of analogues of licochalcone A. **Eur. J. Med. Chem.** v. 39, n. 11, p.993-1000, Nov 2004.

KUBINYI, H. Combinatorial and Computational approaches in structure-based drug design. **Cur. Opin. Drug Discov.**,v. 1, 16-27, 1998.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Mol. Aspects Med.** v. 27, n. 2-3, p. 95-125, Apr-Jun 2006.

KUO, Y. C.; CHEN, C. C.; TSAI, W. J.; HO, Y. H.. Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by *Psychotria serpens*: relationship to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. **Antivir. Res.** v. 51, n. 2, p. 95-109, Aug 2001.

LALL, N.; HUSSEIN, A.A.; MEYER, J.J. Antiviral and antituberculous activity of Helichrysum melanacme constituents. **Fitoterapia**. v. 77, n. 3, p. 230-232, Apr 2006.

LEUNG, A.K.; KELLNER, J.D., DAVIES, H.D. Respiratory syncytial virus bronchiolitis. **J. Natl. Med. Assoc.** v. 97, n. 12, p. 1708-1713, Dec 2005.

LEVIN M.J.; BACON T.H.; LEARY J.J. Resistance of herpes simplex virus infections to nucleoside analogues in HIV-infected patients. **Clin. Infect. Dis.** v. 39, Suppl 5, p. 248-257, Nov 2004.

LEWIS, F.A.; RAE, M.L.; LEHMANN, N.I.; FERRIS, A.A. A syncytial virus associated with epidemic disease of the lower respiratory tract in infants and young children. **Med. J. Aust.** v. 2, p. 932-933, 1961.

LIU, J.; THORP, S.C. Cell surface heparan sulfate and its roles in assisting viral infections. **Med. Res. Rev.** v. 22, n. 1, p. 1-25, Jan 2002.

LITVINOV, V. P. DOTSENKO, V. V.; KRIVOKOLYSKO, S. G Thienopyridines: synthesis, properties, and biological activity. **Russian Chem. Bull.** v. 54, p. 864-904, 2005.

LOPEZ, S.N.; CASTELLI, M.V.; ZACCHINO, S.A. *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivative and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. **Bioorg. Med. Chem.** v. 9, n. 8, p. 1999-2013, Aug 2001.

LUNARDI, F.; GUZELA, M.; RODRIGUES, A.T.; CORREA, R.; EGER-MANGRICH, I.; STEINDEL, M.; GRISARD, E.C.; ASSREUY, J.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R. Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 47, n. 4, p.1449-1451, Apr 2003.

LUPI, O.; PEREIRA JR, A.C. Herpes simples. In: LUPI, O.; DA SILVA, A.G.; FERREIRA JR, A.C. **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento.** Rio de Janeiro: Medsi, p. 43-70, 2000.

LYCKE, E.; JOHANSSON, M.; SVENNERHOLM, B.; LINDAHL, U., Binding of herpes simplex virus to cellular heparan sulphate, an initial step in the adsorption process. **J. Gen. Virol.** v. 72, 1131-1137, May 1991.

MADRID, P.B.; SHERRILL, J.; LIOU, A.P.; WEISMAN, J.L.; DERISI, J.L.; GUY, R.K. Synthesis of ring-substituted 4-aminoquinolines and evaluation of their antimalarial activities. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 15, n. 4, p. 1015-1018 Feb 2005.

MAcNAB, H. Chemistry without reagents: synthetic applications of Flash Vacuum Pyrolysis. **Aldrichim. Acta.** v. 37, p. 19-26, 2004.

MARCELETTI, J.R. Synergistic inhibition of herpesvirus replication by docosanol and antiviral nucleoside analogs. **Antivir. Res.**, v. 56, n. 2, p. 153-166, Nov 2002.

MÅRDBERG, K.; TRYBALA, E.; TUFARO, F.; BERGSTRÖM, T. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein C is necessary for efficient infection of chondroitin sulfate-expressing gro2C cells. **J. Gen. Virol.** v. 83, n. 2, v. 291-300, Feb 2002.

MCDONALD, T.P.; JEFFREE, C.E.; LI, P.; RIXON, H.W.; BROWN, G.; AITKEN, J.D., MACLELLAN, K., SUGRUE, R.J. Evidence that maturation of the N-linked glycans of the respiratory syncytial virus (RSV) glycoproteins is required for virus-mediated cell

fusion: The effect of alpha-mannosidase inhibitors on RSV infectivity. **Virol.** v. 350, n.2, p. 289-301, Jul 2006.

MELEGARI, M.; VAMPA, G.; BENEDETTI, L.; DE BENEDETTI, P.G. Preparation and spectroscopic behavior of acetyl derivatives of sulphonamides. **Farmaco.** v. 31, n. 3, p. 183-193, Mar 1976.

MICHAEL, JP. Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. **Nat. Prod. Rep.** v. 24, n. 1, p. 223-246, Feb 2007.

MONTANARI, C.A. A química medicinal na próxima década. **Quím. Nova**, v. 23, p. 134-137, 2000.

NADAL, S.R.; NADAL, L.R.M. Tumores perianais provocados pelo herpes simples. **Rev. Bras. Colo-Proctol.** v. 27, n.1, Jan./Mar. 2007.

NAHMAS, A.J.; KIBRICK, S. Inhibitory effect of heparin on herpes simplex virus. **J. Bacteriol.** v.87. n. 5, p. 1060-1066, Mar 1964.

NAMVAR, L.; OLOFSSON, S.; BERGSTRÖM, T.; LINDH, M. Detection and typing of Herpes Simplex virus (HSV) in mucocutaneous samples by TaqMan PCR targeting a gB segment homologous for HSV types 1 and 2. **J. Clin. Microb.** v. 43, n. 5, p. 2058-2064, May 2005.

NEYTS, J., DE CLERCQ, E. Effect of polyanionic compounds on intracutaneous and intravaginal herpesvirus infection in mice: impact on the search for vaginal microbicides with anti-HIV activity. **J. Acquir. Immune Def. Synd. Hum. Retrovirol.** v. 10, n. 1, p. 8-12, Sep 1995.

NEWELL, D. R. How to develop a successful cancer drug-molecules to medicines or targets to treatments? **Eur. J. Cancer.** v.41, n. 5, p.676-82, Mar 2005.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. SANDER M.K. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Products.** v. 66, n. 7, p. 1022-1037, Jul 2003.

NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. **Curr. Opin. Chem. Biol.** v.6, n. 3, p.297-305, Jun 2002.

NIELSEN, S.F. BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHONNING, K.; KROMANN, H. Antibacterial chalcones--bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. **Bioorg. Med. Chem.** v. 12, n. 11, p. 3047-3054, Jun 2004.

NINOMIYA, Y.; OHSAWA, C.; AOYAMA, M.; UMEDA, I.; SUHARA, Y.; ISHITSUKA, H. Antivirus agent, Ro 09-0410, binds to rhinovirus specifically and stabilizes the virus conformation. **Virol.** v. 30, n. 2, p. 269-276, Apr 1984.

NINOMIYA, Y.; SHIMMA, N.; ISHITSUKA, H. Comparative studies on the antirhinovirus activity and the mode of action of the rhinovirus capsid binding agents,

chalcone amides. **Antivir. Res.** v. 13, n. 2, p.61-74, Feb 1990.

NUNES, R. J. The Chemistry na biological activity of cyclic imidobenzenesulfonyl derivatives. 1986. 212 p. Thesis. (Doctor of Philosophy in Organic Chemistry) - Hatfield Polytechnic, Hatfield, England 1986.

NYBERG, K.; EKBLAD, M.; BERGSTROM, T.; FREEMAN, C.; PARISH, C.R.; FERRO, V.; TRYBALA, E. The low molecular weight heparan sulfate-mimetic, PI-88, inhibits cell-to-cell spread of herpes simplex virus. **Antivir. Res.** v. 63, n. 1, p. 15-24, Jul 2004.

OIEN, N.L.; BRIDEAU, R.J.; HOPKINS, T.A.; WIEBER, J.L.; KNECHTE, M.L.; SHELLY, J.A. et al. Broad-spectrum antiherpes activities of 4-hydroxyquinoline carboxamides, a novel class of herpesvirus polymerase inhibitors. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 46, n. 3, p.724-730, Mar 2002.

OLOFSSON, S.; BOLMSTEDT, A.; BILLER, M.; MARDBERG, K.; LECKNER, J.; MALMSTROM, B.G.; TRYBALA E.; BERGSTROM T. The role of a single N-linked glycosylation site for a functional epitope of herpes simplex virus type 1 envelope glycoprotein gC. **Glycobiology** v. 9, n. 1 p. 73-81, Jan 1999.

OWA, T.; OKAUCHI, T.; YOSHIMATSU, K.; SUGI, N.H.; OZAWA, Y. A focused compound library of novel N-(7-indolyl)benzenesulfonamides for the discovery of potent cell cycle inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v.10, n. 11, p.1223-1226, Jun 2000.

PARISH, C.R.; FREEMAN, C.; BROWN, K.J.; FRANCIS, D.J.; COWDEN, W.B. Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel in vitro assays for angiogenesis and heparanase activity. **Cancer Res.** v. 59, n. 14, p. 3433-3441, Jul 1999.

PAVIA D. L.; LAMP, G. M.; KRIZ, G. S.; ENGEL, R. G. **Introduction to organic laboratory techniques.** New York: Saunders College Publishing, p. 310-321, 1998.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. ; ENGEL, R.G. **Introduction to Organic Laboratory Techniques: a small-scale approach.** 2nd ed. Belmont (CA): Brooks/Cole-Thomson Learning, 2005. p. 324.

PARASHAR, U.D.; HUMMELMAN, E.G.; BRESEE, J.S.; MILLER, M.A.; GLASS, R.I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. **Emerg. Infect Dis.** v. 9, n. 5, p. 565-572, May 2003.

PAROLIN, C.; GATTO, B.; DEL VECCHIO, C.; PECERE, T.; TRAMONTANO, E.; CECCHETTI, V.; FRAVOLINI, A.; MASIERO, S.; PALUMBO, M.; PALU, G. New anti-human immunodeficiency virus type 1 6-aminoquinolones: mechanism of action. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.47, n. 3, p. 889-896, Mar 2003.

Patent, 464850, 1965 - STERLING DRUG, INC. Aromatic Amine Derivatives and Preparation. **Chem. Abstract.** 1,147,759, 1966.

PATRICK, G.L. **An introduction to Medicinal Chemistry**. 2nd, Oxford: Oxford University, 2001. 622 p.

PHILLPOTTS, R.J.; HIGGINS, P.G.; WILLMAN, J.S.; TYRREL, D.A.; LENOX-SMITH, I. Evaluation of the antirhinovirus chalcone Ro 09-0415 given orally to volunteers. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 14, n. 4, p. 403-409, Oct 1984.

PENG, L.; ZHANG, T.; LI, Y.; LI, Y.; Synthesis of pyrazole derivatives 4(1H)-quinolone and 4-chloroquinoline by thermolysis of arylaminomethylene Meldrum's acid derivative **Synth. Commun.** v. 32, p. 785-791, 2002.

PENNING, T.D.; KHILEVICH, A.; CHEN, B.B.; RUSSELL, M.A.; BOYS, M.L.; WANG, Y.; DUFFIN, T. Synthesis of pyrazoles and isoxazoles as potent $\alpha(v)\beta\alpha3$ receptor antagonists. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 16, n. 12, p. 3156-3161, Jun 2006.

PERTEL, P.E.; SPEAR, P.G. Modified entry and syncytium formation by herpes simplex virus type 1 mutants selected for resistance to heparin inhibition. **Virology** v. 226, n. 1, p. 22-33, Dec 1996.

PETERSEN, E. Malaria chemoprophylaxis: when should we use it and what are the options? **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.** v. 2, n. 1, p. 119-132, Feb 2004.

PONCE, N.M.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B.; FLORES, M.L.; STORTZ, C.A. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. **Carbohydr. Res.** v. 338, n. 2, p.153-165, Jan 2003.

PRANDOTA, J. Furosemide: progress in understanding its diuretic, anti-inflammatory, and bronchodilating mechanism of action, and use in the treatment of respiratory tract diseases. **Am. J. Ther.** v. 9, n. 4, p. 317-328, Jul-Aug 2002.

RAAKE, W.; KLAUSER, R.J.; ELLING, H.; MEINETSBERGER, E. Anticoagulant and antithrombotic properties of synthetic sulfated bis-lactobionic acid amides. **Thromb Res.** v. 56, n. 6, p. 719-730, Dec 1989.

REEFSCHLAAGER, J.; BENDER, W.; HALLENBERGER, S.; WEBER, O.; ECKENBERG, P.; GOLDMANN, S.; HAERTER, M.; BUERGER, I.; TRAPPE, J. Novel non-nucleoside inhibitors of cytomegaloviruses (BAY 38-4766): in vitro and in vivo antiviral activity and mechanism of action. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 48, n. 6, p. 757-767, Dec 2001.

REIS, A. D. **Incidência de doenças de vias aéreas pelo vírus sincicial respiratório humano em coorte de recém-nascidos do município de São Paulo: comparação de técnicas diagnósticas e caracterização molecular**. 2006.132 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ROSSELLO, A.; NUTI, E.; CATALANI, M.P.; CARELLI, P.; ORLANDINI, E. A new development of matrix metalloproteinase inhibitors: twin hydroxamic acids as potent inhibitors of MMPs. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 15, n. 9, p. 2311-2314, May 2005.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D.M. Herpes Simplex virus and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MALCOLM, **A.M.**; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (eds.) **Fields Virology**. 4th ed. v. 1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

SANTOS, L. dos; **Avaliação dos potencial hipolipemiante de algumas chalconas sintéticas utilizando diferentes modelos experimentais**. 2003. 157 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2003.

Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Divisão de Imunização e Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Coordenadoria de Controle de Doenças. Vaccine against rotavirus Vacina contra rotavirus. **Rev. Saúde Pública**. v.40, n. 2, p. 355-358, 2006.

SCHLEISS, M.R.; BERNSTEIN, D.I.; MCVOY, M.A.; STROUP, G.; BRAVO, F.; CREASY, B.; MCGREGOR, A.; HENNINGE, R.K.; HALLENBERGE, S. The non-nucleoside antiviral, BAY 38-4766, protects against cytomegalovirus(CMV) disease and mortality in immunocompromised guinea pigs. **Antivir. Res.** v.65, n. 1, p. 35-43, Jan 2005.

SCIABICA, K.S.; DAI, Q.J.; SANDRI-GOLDIN, R.M. ICP27 interacts with SRPK1 to mediate HSV splicing by altering SR protein phosphorylation. **EMBO J.** v. 22, n. 7, p. 1608-1619, Apr 2003.

SHUKUROV, S.S.; KUKANIEV, M.A.; NASYROV, I.M.; ZAKHAROV, K.S.; KARAKHANOV, R.A. Electrophilic substitution in 2-bromo-7-methyl-5H—1,3,4-thiadiazol [3,2 -a]pyrimidin-5-one. **Russian J. Gen. Chem.** v. 63, p. 1610-1612, 1993.

SHUKLA D.; SPEAR P.G. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. **J. Clin. Invest.** v. 108, n. 4, p. 503-510, Aug 2001.

SHUKLA, D.; LIU, J.; BLAIKLOCK, P.; SHWORAK, N.W.; BAI, X.; ESKO, J.D.; COHEN, G.H.; EISENBERG, R.J.; ROSENBERG, R.D.; SPEAR, P.G. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. **Cell.** v. 99, n. 1, p.13-22, Oct 1999.

SIDWELL R.W.; BARNARD, D.L. Respiratory syncytial virus infections: recent prospects for control. **Antivir. Res.** v. 71, n. 2, p.379-390, Sep 2006.

SILVA, L.E **Heterociclos Aromáticos Nitrogenados** – Síntese e Potencial Quimioterápico. 2006. 189 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemática, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

SILVA, L. E.; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; Nunes, R. J.; SIMÕES, C. M. O.; FORO, S. Quinolin-8-yl 2,5dichlorobenzenesulfonate. **Acta Cryst.** Section E, v. 62, p. 2104 - 2105, 2006.

SILVERMAN, R.B. **The organic chemistry of drug design and drug action**, San Diego: Academic, 1992. 422 p.

SIMÕES, C.M.O.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. **Phytoth. Res.** v. 21, n. 4, p. 317-325, Jun 1999.

SJOGREN-JANSSON E.; JEANSSON, S. Large-scale production of monoclonal antibodies in dialysis tubing. **J. Immunol. Methods.** v. 84, n. 1-2, p.359-64, Nov 1985.

SJOGREN-JANSSON E.; JEANSSON S. Growing hybridomas in Dialysis Tubing: Optimization of the technique. In: ZOLA, H. (ed.), **Laboratory Methods in Immunology**, v. 1, Boca Raton: CRC press. Inc., p. 41-50, 1990.

SMITH, R.W.P.; MALIK P.; CLEMENTS. J.B. The herpes simplex virus ICP27 protein: a multifunctional post-transcriptional regulator of gene expression. **Biochem. Soc. Trans.** v. 33, n. Pt 3, p. 499-501, Jun 2005.

SOUZA, T.M.; DE SOUZA, M.C.; FERREIRA, V.F.; CANUTO, C.V.; MARQUES, I.P.; FONTES, C.F.; FRUGULHETTI, I.C. The chloroquinolinic derivative 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-(beta-D-ribofuranosyl) quinoline-3-carboxylic acid inhibits HSV-1 adsorption by impairing its adsorption on HVEM. **Arch. Virol.** v. 152, n. 7, p. 1417-1424, 2007.

SOUZA, T.M.; DE SOUZA, M.C.; FERREIRA, V.F.; CANUTO, C.V.; MARQUES, I.P.; FONTES, C.F.; FRUGULHETTI, I.C. Inhibition of HSV-1 replication and HSV DNA polymerase by the chloroquinolinic ribonucleoside 6-chloro-1,4-dihydro-4-oxo-1-(beta-D-ribofuranosyl)quinoline-3-carboxylic acid and its aglycone. **Antivir. Res.** v. 77, n. 1, p. 20-27, Jan 2008.

SPANDIDOS, D. A.; GRAHAM, A. F. Infectious Center Assay for Complementation and Recombination Between Mutants of Reovirus **J. Virol.** v. 18, n. 3, p. 1151-1154, Jun 1976.

SPEAR, P.G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cell. Microbiol.** v. 6, n. 5, p. 401-410, May 2004.

SUBBIAH PANDI, A.; VELMURUGAN, D.; SHANMUGA SUNDARA RAJ, S.; FUN, H.-K.; BANSAL, M. C. **Acta Cryst. C.** v. 59, p. 0302-0304, 2003.

SUPURAN, C.T.; SCOZZAFAVA, A.; CASINI, A. Carbonic anhydrase inhibitors. **Med. Res. Rev.** v. 23, n. 2, 146-189, Mar 2003.

SUPURAN, C.T.; CASINI, A.; SCOZZAFAVA, A. Protease inhibitors of the sulfonamide type: anticancer, antiinflammatory, and antiviral agents. **Med. Res. Rev.** v. 23, n. 5, p. 535-558. Sep 2003.

SURLERAUX, D. L. N. G.; TAHRI, A.; VERSCHUEREN, W. G.; PILLE, G. M. E. Design of HIV-1 protease inhibitors active on multidrug-resistant virus. **J. Med.**

Chem., v. 48, n. 6, p.1965-73. Mar 2005.

TAKAHASHI, K.; MATSUDA, M.; OHASHI, K.; TANIGUCHI, K.; NAKAGOMI, O.; ABE, Y.; MORI, S.; SATO, N.; OKUTANI, K. SHIGETA, S. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. **Antivir. Res.**, v. 49, n. 1, p. 15-24, Jan 2001.

TAKESHIMA, H. Antiviral agents In: OMURA, S. **The search for bioactive compounds from microorganisms**. New York: Sprienger-Verlag Series, 1992. p. 50.

THI, T.N.; DEBACK, C.; MALET, I.; BONNAFOUS, P.; AIT-ARKOUB, Z.; AGUT, H. **Antivir. Res.** v. 69, n. 3, p. 152-157, Mar 2006.

THOMAS, G. **Química medicinal**: uma introdução. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 413 p.

THOMSEN, D.R.; OIEN, N.L.; HOPKINS, T.A.; KNECHTEL, M.L.; BRIDEAU, R.J.; WATHEN, M.W.; HOMA, F.L. Amino acid changes within conserved region III of the herpes simplex virus and human cytomegalovirus DNA polymerases confer resistance to 4-oxo-dihydroquinolines, a novel class of herpesvirus antiviral agents. **J. Virol.** v.77, n. 3, p.1868-1876, Feb 2003.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

TRYBALA, E.; SVENNERHOLM, B.; BERGSTRÖM, T.; OLOFSSON, S.; JEANSSON, S.; GOODMAN, J.L. Herpes simplex virus type 1-induced hemagglutination: glycoprotein C mediates virus binding to erythrocyte surface heparan sulfate. **Virol.** v. 67, n. 3, p. 1278-1285, Mar 1993.

TRYBALA E.; LILJEQVIST J.A.; SVENNERHOLM B.; BERGSTROM T. Herpes simplex virus types 1 and 2 differ in their interaction with heparin sulfate. **J. Virol.** v. 74, n. 19, p. 9106-9114, Oct 2000.

TRYBALA, E.; ROTH, A.; JOHANSSON, M.; LILJEQVIST, J.A.; REKABDAR, E.; LARM, O.; BERGSTRÖM, T. Glycosaminoglycan-binding ability is a feature of wild-type strains of herpes simplex virus type 1. **Virol.** v. 302, n. 2, p. 413-419 Oct 2002.

UCHIUMI, F.; HATANO, T.; ITO, H.; YOSHIDA, T.; TANUMA, S. Transcriptional suppression of the HIV promoter by natural compounds. **Antivir. Res.** v. 58, n. 1, p. 89-98, Mar 2003.

VAHERI, A. Heparin and related polyionic substances as virus inhibitors. **Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.** v. 171, n. 5, p.1-98. May 1964.

VAILLANCOURT, V.A.; CUDAHY, M.M.; STALEY, S.A.; BRIDEAU, R.J., CONRAD, S.J.; KNECHTEL, M.L.; OIEN, N.L. Naphthalene carboxamides as inhibitors of human cytomegalovirus DNA polymerase. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 18, n. 18, p. 2079-2081. Sep 2000.

VARELLA, R. B.; PIRES, I. L.; SARAIVA, C. A.; GUIMARÃES, A. C. C.; GUIMARÃES, M. A. A. M. Laboratorial diagnosis of herpes simplex virus infection (HSV) in transplanted and non-transplanted patients. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 41, n. 4, p. 257-262, Aug 2005.

VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Quím. Nova**, v. 28, p.95-102, 2005.

VINOKUROVA, N.M.; FELDMAN, I. Synthesis and properties of some sulfonamides of the quinoline series. **Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal** v. 2, p. 34-36, 1968.

VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D.A. Leads for antivirals from traditional medicines. In: PREBDERGASTM, H.D.V.; ETKIN, N.L.; HARRIS, D.R.; HOUGHTON, P.J. (Ed.). **Plants for Food and Medicine**. London: Royal Botanic Gardens, 1998. p.333-344.

VISALLI, R.J.; VAN ZEIJL, M. DNA encapsidation as a target for anti-herpesvirus drug therapy. **Antivir. Res.** v.59, n. 2, p.73-87, Jul 2003.

VRANJAC, A. Diarréia e rotavírus. **Rev. Saúde Pública**, v. 38, n. 6, p.844-845, Dec 2004.

VOGEL, A. I.; FURNISS, B. S. **Vogel's textbook of practical organic chemistry**. 5th. / rev. by FURNISS, B.S. HANNAFORE, A.J.; SMITH, P.W.; TATCHELL, A.R. New York: Longmann Scientific & Technical, 1989. 1514p.

VOYLES, B.A. **The biology of viruses**. St Louis: Mosby-Year Book, 1993. p. 386.

WALTER, M.E.; MORA, C.; MUNDSTOCK, K.; DE SOUZA, M.M.; DE OLIVEIRA PINHEIRO, A.; YUNES, R.A.; NUNES, R.J. Antinociceptive properties of chloromaleinimides and their sulphonyl derivatives. **Arch. Pharm. (Weinheim)**. v. 337, n. 4, p.201-206, Apr 2004.

WEBER, P.C. Small Molecule Inhibitors of Herpes Simplex Virus Type 1 Immediate Early Gene Expression. **Drug News Perspect.** V. 15, p. 299-305, 2002.

WHITE, D.O.; FENNER, F.J. **Medical Virology**. 4th. ed., San Diego: Academic, 1994. 603 p.

WHITLEY, R.J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **Lancet** v. 357, n. 9267, p. 1513-1518, May 2001. Bottom of Form

WIEDBRAUK, D. L.; SHERYL, L.G.J. **Manual of clinical virology**. New York: Rave, 1992. 275 p.

WINUM, J.Y.; SCOZZAFAVA, A.; MONTERO, J.L.; SUPURAN, C.T. Therapeutic potential of sulfamides as enzyme inhibitors. **Med. Res. Rev.** v. 26, n. 6, p. 767-792, Nov 2006.

WITVROUW, M.; DE CLERCQ, E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. **Gen. Pharmacol.** v. 29, n. 4, p. 497-511, Oct 1997.

WU, J.H.; WANG, X.H.; YI, Y.H.; LEE, K.H. Anti-AIDS agents 54. A potent anti-HIV chalcone and flavonoids from genus *Desmos*. **Bioorg. Med. Chem Lett.** v.13, n. 10, p.1813-1815, May 2003.

WUDUN, D.; SPEAR, P.G. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. **J Virol.** v. 63, n. 1, p. 52-58, Jan 1989.

WYDE, P.R.; LAQUERRE, S.; CHETTY, S.N.; GILBERT, B.E.; NITZ, T.J.; PEVEAR, DC. Antiviral efficacy of VP14637 against respiratory syncytial virus in vitro and in cotton rats following delivery by small droplet aerosol. **Antivir. Res.** v. 68, n. 1, p. 18-26, Oct 2005.

YASIN, S.R.; AL-NAKIB, W.; TYRRELL, D.A. Pathogenicity for humans of human rhinovirus type 2 mutants resistant to or dependent on chalcone Ro 09-0410. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 34, n. 6, p. 963-6. Jun 1990.

YANG, G.F.; HUANG, X. Development of quantitative structure-activity relationships and its application in rational drug design. **Curr. Pharm. Des.** v. 12, n. 35, p. 4601-11, 2006.

YE, C.L.; LIU, J.W.; WEI, D.Z.; LU, Y.H.; QIAN, F. In vitro anti-tumor activity of 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone against six established human cancer cell lines. **Pharmacol. Res.** v. 50, n. 5, p. 505-510, Nov 2004.

YU, K.L.; WANG, X.A.; CIVIELLO, R.L.; TREHAN, A.K.; PEARCE, B.C.; YIN, Z.; COMBRINK, K.D.; GULGEZE, H.B.; ZHANG, Y.; KADOW, K.F.; CIANCI, C.W.; CLARKE, J.; GENOVESI, E.V.; MEDINA, I.; LAMB, L.; WYDE, P.R.; KRYSTAL, M.; MEANWELL, N.A. Respiratory syncytial virus fusion inhibitors. Part 3: Water-soluble benzimidazol-2-one derivatives with antiviral activity in vivo. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 16, n. 5, p. 1115-1122, Mar 2006.

XU, Z.; KUANG, M.; OKICKI, J.R.; CRAMER, H.; CHAUDHARY, N. Potent inhibition of respiratory syncytial virus by combination treatment with 2-5A antisense and ribavirin. **Antivir. Res.** v. 61, n. 3, p. 195-206, Mar 2004.

ZACHAROPOULOS, V.R.; PHILLIPS D.M., Vaginal formulations of carrageenan protect mice from herpes simplex virus infection. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v. 4, n. 4, p. 465-468, Jul 1997.

ZHANG, M., CHEUNG, P.C., OOI, V.E., ZHANG, L. Evaluation of sulfated fungal beta-glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a potential water-soluble anti-viral agent. **Carbohydr. Res.** v. 339, n. 13, p. 2297-2301, Sep 2004.

ZHU, W.; CHIU, L.C.; OOI, V.E.; CHAN, P.K.; ANG, P.O. JR. Antiviral property and mechanisms of a sulphated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens*

against Herpes simplex virus type 1. **Phytomedicine**. v.13, n. 9-10, p. 695-701, Nov 2006.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.(Org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade; Florianópolis: Editora da UFSC, 2003. p. 578-614.

APÊNDICE 1

Artigos publicados

1. ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; SILVA, L. E.; NUNES, R. J.; SIMÕES, C. M. O.; FORO, S. N-Benzylquinoline-8-sulfonamide. **Acta Cryst.** Section E, v.E62, p. 03693-03694, 2006.
2. SILVA, L. E.; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; NUNES, R. J.; SIMÕES, C. M. O.; FORO, S. Quinolin-8-yl 2,5dichlorobenzenesulfonate. **Acta Cryst.** Section E, v. 62, p. 2104 -2105, 2006.
3. ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; JOUSSEF, A. C.; SIMÕES, C. M. O.; NUNES R. J.; BORTOLUZZI, A. J. 5-(2-Benzoylphenyl)-N-benzyl-2-methoxybenzenesulfonamide. **Acta Cryst.** Section E, v. 63, p. 03275-03276, 2007a.
4. ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; SILVA, L. E.; SIMÕES, C. M. O.; NUNES, R. J.; FORO, S. N-(4-Methoxybenzyl)quinoline-8-sulfonamide. **Acta Cryst.** Section E, v. 63, p. 03059-03060, 2007b.
5. ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; SILVA, L. E.; SIMÕES, C. M. O.; NUNES, R. J.; FORO, S. 8-(Piperidin-1-ylsulfonyl)quinoline. **Acta Cryst.** Section E, v. 63, p.01638-01639, 2007c.
6. ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; DE OLIVEIRA, K.N.; GASPAR-SILVA, D.; PACHECO, L.K.; JOUSSEF, A.C.; STEINDEL, M.; SIMÕES, C.M.O; DE SOUZA, A.M.T.; MAGALHAES, U.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; NUNES, R.J.; CASTRO, H.C. Synthesis, Biological evaluation and SAR of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives with Potential Antileishmanial Activity. **Eur. J. Med. Chem.** 2008.

**Synthesis, Biological evaluation and SAR of sulfonamide
4-methoxychalcone derivatives with Potential
Antileishmanial Activity**

Carla R. Andrighetti-Fröhner^a, Kely N.de Oliveira^a, Daniela Gaspar-Silva^c, Letícia K. Pacheco^c, Antônio C. Joussef^a, Mário Steindel^c, Cláudia M. O. Simões^b, Alessandra M.T. de Souza^{d,e}, Uiaran O. Magalhaes^d, Ilídio F. Afonso^d, Carlos R. Rodrigues^{d*}, Ricardo J. Nunes^{a*}, Helena C. Castro^{e*}

^aDepartamento de Química, ^bDepartamento de Ciências Farmacêuticas, ^cDepartamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Campus Universitário Trindade, Florianópolis, SC, Brazil.

^d ModMolQSAR, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

^e LABioMol, Departamento de Biologia Celular e Molecular, IB/CEG,- Universidade Federal Fluminense, CEP 24001-970, Niterói, RJ, Brazil.

Correspondent addresses:

Helena Carla Castro. Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, 24020-150, Niterói, RJ, Brazil. Phone +55+21-26292294. E-mail: hcastrorangel@yahoo.com.br

Ricardo J. Nunes. Universidade Federal de Santa Catarina. Campus Universitário Trindade, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil. Phone: (48) 37216845. Ramal: 236. E-mail: nunesqmc@ufsc.br

Carlos Rangel Rodrigues. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, ModMolQSAR, 24020-150, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Phone +55+21 25626444. E-mail: rangel@pharma.ufrj.br

Abstract – Despite of the clinical importance of leishmaniasis, an infectious disease that affects 12 thousand million people in 88 countries, the treatment is still unsatisfactory due to its limited efficacy, cost expensive and undesirable side effects. Aiming to develop new antileishmanial lead compounds, we used a rational approach to synthesize a new set of sulfonamides 4-methoxychalcone derivatives (**3a-3i**) and evaluate the sulfonamide and methoxy moieties as promising adding-groups to chalcones. On that purpose we tested this new set against *L. braziliensis* promastigotes and intracellular amastigotes and determined its cell toxicity profile. Interestingly all compounds presented a concentration-dependent antileishmanial profile and the benzylamino derivative (**3i**) showed a biological activity better than pentamidine. None of these compounds affected *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, which suggests a specific antileishmanial profile. The structure-activity analysis of these sulfonamides 4-methoxychalcone derivatives pointed the molecular volume, the HOMO density concentrated in the chalcone moiety and the conformational structure of the compounds as important structural and stereoelectronic features for the antileishmanial activity. In addition, these compounds also fulfilled Lipinski rule of 5 and presented druglikeness similar to antileishmanial drugs. Altogether these results point the sulfonamides 4-methoxychalcone derivatives as potential lead compounds for designing new candidates for leishmaniasis treatment.

Keywords: Leishmaniasis, SAR, sulfonamide 4-methoxychalcones, antiparasite, promastigote, amastigote.

1. Introduction

Disseminated leishmaniasis is an emerging infectious disease, mostly due to *Leishmania braziliensis*. Importantly the disease presents clinical and histopathological features where *L. braziliensis* is responsible for both cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in several Latin American countries [1]. Therefore, currently these parasitic diseases cause significant morbidity and mortality, mainly in the developing world [2].

Despite the progress in important fundamental knowledge about *L. braziliensis*, the current chemotherapy for leishmaniasis is still unsatisfactory due to the limited efficacy, long-term treatment, cost expensive and undesirable side effects [3-5]. The development of drug resistance by the pathogens, especially in HIV-*Leishmania* co-infected patients, has also aggravated the health problem [6]. Thus, there is an urgent need for the development of new, efficient and safe drugs against leishmaniasis.

Natural and synthetic chalcones are described presenting a wide range of potential pharmacological profiles [7], such as anti-inflammatory [8], trypanocidal [9], antibacterial [10], antiviral [11,12], antitumoral [13], antimalarial [14], and antileishmanial [15-18] activities. Recently a series of substitution-containing chalcone derivatives (**1**) have been reported as antileishmanial agents (Scheme 1) [9]. In addition, sulfonamide analogues based on the herbicide oryzalin (**2**), presented antiparasitic activity including an antileishmanial profile (Scheme 1) [19].

In this work we used a rational approach and synthesized a new set of sulfonamides 4-methoxychalcone derivatives (3a-3i) to identify the sulfonamide and methoxy as promising adding-groups to chalcones and develop new lead antiparasite compounds. In addition we focused on the Structure-Activity Relationships (SAR) of

these sulfonamides 4-methoxychalcones series to determine structural and stereoelectronic features that could lead to the antileishmanial profile (Scheme 1). On that purpose we analyzed the role of groups with different electronic and volume properties in the sulfonamide moiety of the 4-methoxychalcones B-ring.

To compare with other chalcone series described in literature [9], the new 3-sulfonamide 4-methoxychalcone series were evaluated for its antiparasite activity against *L. braziliensis* promastigotes and *T. cruzi* epimastigotes. We also tested the most active compound against *L. braziliensis* intracellular amastigotes to evaluate its ability for decreasing the parasite burden in infected host cells. In addition the cytotoxicity profile in mouse peritoneal macrophages was evaluated, which allowed the determination of their selectivity index. Finally, these biological effects were analyzed with the compounds different theoretical parameters (Dipole, EHomo, ELumo, cLogP, Molecular Weight and Volume, higher HOMO coefficient orbital and density) calculated by using a molecular modeling approach in the structure-activity relationship (SAR) study [20].

2. Results and Discussion

2.1. Design and Synthesis

The sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives were prepared as shown in Scheme 2. The 4-methoxychalcone (**3**) was obtained by aldolic condensation of 4-methoxybenzaldehyde and acetophenone according to general literature procedure [19] (Scheme 2).

Treatment of 4-methoxychalcone (**3**) with chlorosulfonic acid at room temperature for one week [21] afforded the sulfonyl chloride derivative. Preparation of

sulfonamides **3a-3i** was accomplished by reaction of sulfonyl chloride derivative with different amines in the presence of methanol at room temperature. We characterized all the synthesized compounds by spectroscopic data such as IR NMR and elemental analysis [22]. The chalcones **3a**, **3b** and **3e** were prepared as previously described [22,23].

2.2. Biological Evaluation

In this work we evaluated the inhibitory profile of the 4-methoxychalcone (**3**) and sulfonamides 4-methoxychalcone derivatives (**3a-3i**) against *L. braziliensis* promastigote forms (Figure 1A). Interestingly all the chalcones tested showed a concentration-dependent inhibitory effect on the *in vitro Leishmania* growth assays (Figure 1A).

Interestingly, the addition of sulfonamide generated derivatives with a better inhibitory profile against *L. braziliensis* than the 4-methoxychalcone (**3**), except for the aniline substituted sulfonamide 4-methoxychalcone (**3e**) (Figure 1A and Table 1). According to our results, mostly of the sulfonamides 4-methoxychalcone derivatives showed a more potential inhibitory activity ($IC_{50} = 3.5 \pm 0.6 \mu M - 8.6 \pm 0.4 \mu M$) than that of 4-methoxychalcone (**3**) ($IC_{50} = 16.6 \pm 1.6 \mu M$) and other chalcones without substituent groups such as those described by Lunardi and coworkers [9] ($IC_{50} = 13.7 \mu M - 182.3 \mu M$) (Table 1). Although our compounds were less active than amphotericin B ($IC_{50} = 0.3 \pm 0.02 \mu M$), they were more active than pentamidine isothionate ($IC_{50} = 19.6 \mu M$) [25], one current drug used for leishmaniasis treatment.

The addition of the aniline on the substituent group in the compound **3e** was the only one that negatively affected the inhibitory activity on growth of *L. braziliensis* promastigotes forms ($IC_{50} = 69 \pm 3.7 \mu M$) compared to **3**. Importantly, all substitutions (electron-acceptor or electron-donor substituents) at the sulfonamide moiety or at *para* position of aniline aromatic ring kept the antileishmanial profile (compounds **3a-3d** and **3f-3h**) suggesting the feasibility of new interactions on these positions (Figure 1 and Table 1).

The compound **3i** showed the best profile against *L. braziliensis* promastigotes ($IC_{50} = 3.5 \pm 0.6 \mu M$). Apparently the benzylamino group significantly contributes to this activity, since this compound was about 20-fold more potent than the compound **3e** ($IC_{50} = 69.0 \pm 3.7 \mu M$) (Figure 1 and Table 1). Notably the addition of the carbon spacer on the substituent (**3i**) was enough to

avoid the deleterious effect of the aniline group (**3e**), probably allowing hydrophobic interactions with the parasite target. We also carried out amastigotes assays with the most active compound (**3i**) to evaluate its ability for reducing the parasite load in infected host cells. In the untreated controls we obtained an infection rate of 30.1% (mean = 2.9 parasites/infected cell). The results showed that **3i** is able to reduce significantly the number of intracellular amastigotes suggesting its potential as a lead antileishmanial compound (Figure 1D).

In this work we experimentally evaluated the cytotoxic activity of 4-methoxychalcone (**3**) and sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives (**3a-i**) against mouse peritoneal macrophages. Our results showed CC₅₀ values ranging from 57.8 ± 4.8 µM to 105.7 ± 6.5 µM (Figure 1B). Interestingly the presence of the substituents of the sulfonamide group seems to play a more important role for the antileishmanial activity than to the cytotoxicity profile (Figure 1 and Table 1). The CC₅₀ values were used to calculate the selectivity index (SI) for these derivatives, which were higher than the non-substituted 4-methoxychalcone, except for **3c** and **3e**. This result showed the improvement of the selectivity index of the derivatives compared to the leading compound (Figure 1C).

Finally, we also tested the sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives effects against *T. cruzi* epimastigotes forms. However, different from the chalcone series described by Lunardi et al., 2003 that was active on both *L. braziliensis* (21.9 µM - 182.3 µM) and *T. cruzi* strains (24.8 µM - 126.4 µM), this new series showed no activity in concentrations up to 500 µM (not shown). These data suggest that the sulfonamide 4-methoxychalcone series target is probably different from that of

Lunardi series [9], due to its specificity for Leishmania. Previous studies showed that chalcone derivatives might act in the parasite mitochondria by the inhibition of fumarate reductase, succinate dehydrogenase, NADH dehydrogenase, or succinate- and NADH-cytochrome *c* reductases activity [26,27]. However, as these enzymes may be present in *T. cruzi* and the series described herein does not affect this parasite, further investigation about its mechanism of action should be performed.

2.3. Molecular Modeling and SAR studies

In this study we compared the biological profile of this new series with its structural features to establish a structure-activity relationship. All calculations were performed using SPARTAN'06 (Wavefunction Inc., Irvine, CA, 2000). The structures were minimized and the equilibrium geometry was obtained in vacuum using a semi-empirical AM1 module. To evaluate the electronic properties of the AM1 minimal energy conformations, they were submitted to a Density Functional Theory (DFT) calculation with a 6-31G* basis set of the SPARTAN'06 package. The electronic properties (HOMO and LUMO energy, HOMO density and dipole moment) were calculated for all compounds. Theoretical logP (clogP) was calculated at AM1 semi-empirical level using the Villar method, included in Spartan [24,28-30].

An overall analysis of the activity of the compounds showed that the addition of sulfonamide substituent increased the activity of these compounds in comparison to compound **3**. Interestingly the increase of molecular volume,

weight and dipole moment of these derivatives seem to improve the activity compared to **3** (Table 1) except for **3e**.

The conformational analysis of these compounds inferred that the enhancement of the biological activity is probably due to the new interactions in a new plane of these molecules caused by the addition of the sulfonamide group (Figure 2). The HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) density of the most active compounds is concentrated in the center of the chalcone moiety (the carbonyl group and unsaturated linker between A and B rings - scheme 1) thus suggesting a role for these regions in the antileishmanial activity (Figure 2).

The aniline **3e** derivative presents a substituent that significantly compromised the biological activity, compared to **3**, and that reoriented the HOMO density to the substituent (Figure 2). Importantly, the addition of chlorine, an electron-acceptor atom, in **3f** restored the activity to a significant level. However the volume, the steric and electronic features are probably important to the antileishmanial profile of this series as the addition of two chlorines (**3g**) or a methoxy (**3h**) group, which possess a bigger volume and different electrostatic features, decreased the activity in more than 2 fold compared to **3f**. However, it should be considered that these substituents still contributed for the activity as these derivatives were more potent than **3e** (Table 1).

Interestingly the addition of a spacer (C1) in the **3i** structure, the most active compound, led to the best activity and reoriented the HOMO density to the chalcone moiety, which apparently contributed to the antileishmanial profile compared to **3e**. The most stable conformation of this derivative revealed a π - π

stacking interaction between the benzyl and the chalcone ring, which may be important for the interaction with the target and for avoiding the predicted prohibitive areas (Figure 2 and 3).

We also evaluated some electronic properties of the sulfonamide 4-methoxychalcone chalcone derivatives including HOMO and LUMO (Highest and Lowest Unoccupied Molecular Orbitals) energy values, HOMO and LUMO orbital coefficients distribution, and molecular electrostatic potential (MEP). Our results showed that sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives led to different HOMO and LUMO energies values, and MEPs that alone did not present any direct correlation with the antileishmanial activity (Table 1 and Figure 2).

In the effort to study the hydrophobic pattern, we calculated the theoretical parameters related to the oral bioavailability, according to Lipinski rule of 5 [31] (Table 1). Our results revealed that the sulfonamide 4-methoxychalcone lipophilicity ($2.21 < \text{cLogP} < 4.60$) is not greater than 5.0, which, according to Lipinski, is an important feature for good drug absorption and permeation [32-34](Table 1).

In addition the molecular volume and weight of derivatives ($346.07 \text{ \AA}^3 < \text{MV} < 419.38 \text{ \AA}^3$ and $345.42 < \text{MW} < 462.35$) are similar to more than 80% of all Fluka traded drugs ($\text{MW} < 450 \text{ Da}$) and to that determined by Lipinski "Rule of 5" [31-34]. In fact, according to our research, most of the sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives evaluated ($2.21 < \text{LogP} < 4.60$, $345.42 \text{ Da} < \text{MW} < 423.49 \text{ Da}$, hydrogen bond acceptors = 2-5 and donors = 0-1) fulfilled all Lipinski rules, which states that most "drug-like" molecules have $\text{logP} \leq 5$, molecular weight ≤ 500 , number of hydrogen bond acceptors ≤ 10 , and donors

≤ 5 (Table 1). These data may suggest the potentiality of these derivatives as new candidate to antileishmanial agents.

Currently, there are many approaches that assess druglikeness of compounds based on topological descriptors, fingerprints of molecular druglikeness, structural keys or other properties as clogP and molecular weights [33]. In this work we used the Osiris program (www.organic-chemistry.org/prog/peo) for calculating the fragment-based druglikeness of all compounds and other antileishmanial drugs including pentamidine and glucantime (Figure 3). Our theoretical data showed that the most active compounds presented a druglikeness value higher than the compounds currently used on therapy and evaluated in this work (Figure 3). In this study we also verified the drug score, which combines druglikeness, clogP, logS, molecular weight, and toxicity risks in one value and that may be used to consider the compound overall potential to qualify for a drug. Our data showed that compound **3i** presented a close value to pentamidine and a good profile based on the program values (Figure 3) [24,28-30].

According to our theoretical toxicity evaluation of the tumorigenic, irritant and reproductive profile of the sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives (**3a-i**), they show a low profile for these toxicity effects similar to glucantime and the non-substituted methoxychalcone (Figure 3), except for **3h** that presented a medium tumorigenic profile (not shown). It is important to notice that the toxicity predicted herein neither is a fully reliable toxicity prediction, nor guarantees that these compounds are completely free of any toxic effect. However, it reinforced the promising profile of these compounds for further experimental investigation [24,28-30].

3. Conclusion

In conclusion, our data show that the combination of two different pharmacophoric groups (*i.e.* chalcone and sulfonamide) enhanced the derivatives antileishmanial activity at least two fold compared to **3** and other chalcones [9]. The sulfonamides 4-methoxychalcone derivatives exhibited a potential antileishmanial activity *in vitro* where compound **3i** presented the highest activity against *L. braziliensis*. The structure-function analysis revealed that volume; the HOMO density concentrated in the chalcone moiety, and the conformational structure of the compounds are important structural and stereo electronic features for the antileishmanial activity. The theoretical study of these molecules also showed that they fulfilled Lipinski rule of 5 and present druglikeness similar to antileishmanial drugs. These results point the sulfonamides 4-methoxychalcone derivatives as lead compounds for designing new candidates for leishmaniasis treatment.

4. Experimental protocols

4.1. Chemistry

All reagents and solvents used were analytical grade. TLC was carried out using silica gel F-254 Glass Plate (20 x 20 cm). The ^1H Nuclear Magnetic Resonance (200-400 MHz) and ^{13}C -NMR (50-100 MHz) spectra were obtained from Bruker AC-200F and Varian model Unity (Varian Oxford AS-400 spectrometer) using tetramethylsilane as internal standard. The values of the

coupling constants (J) are given in hertz. Fourier transform infrared (FT-IR) absorption spectra were recorded in a Perkin-Elmer 16PC spectrophotometer. The solid samples were measured using potassium bromide pellets. Microanalyses were carried out on a Carlo Erba EA 1110 instrument.

General procedure for the preparation of compounds 3a-3i. The sulfonyl chloride was treated with benzylamine in methanol at 0 °C. The mixture was reacted at room temperature for 2 h and was then poured onto iced-water. The precipitate was collected by filtration, washed with ice methanol, dried and recrystallized in ethanol. Compound **3a**: Yield 43%, m.p. 140-144°C (Lit. [22] 140-141°C). Compound **3b**: Yield 40%, m.p. 149-150°C, IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 1659, 1595, 1323, 1217, 1144, 700. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , ppm) δ : 8.30 (s, 1H, Ar-H), 8.05 (d, 2H, Ar-H), 7.76 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, olefinic H), 7.48 (m, 5H, Ar-H), 7.04 (d, 1H, Ar-H), 3.98 (s, 3H, OCH_3), 3.35 (q, 4H, CH_2), 1.13 (t, 6H, CH_3). ^{13}C NMR (50MHz, CDCl_3 , ppm) δ : 190.10, 157.99, 142.75, 137.97, 134.75, 132.83, 130.48, 129.88, 128.60, 128.46, 127.35, 121.46, 112.41, 56.13, 41.78, 14.24. Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_4\text{S}$ C, 64.32; H, 6.21; N, 3.75; S, 8.59. Found C, 64.00; H, 6.11; N, 3.73; S 8.03 %. Compound **3c**: Yield 51%, m.p. 162-166°C, IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 1661, 1594, 1328, 1217, 1148, 701. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , ppm) δ : 8.3 (s, 1H, Ar-H), 8.01(d, 2H, Ar-H), 7.81 (d, $J = 14.3$ Hz, 1H, olefinic H), 7.77 (d, 1H, Ar-H), 7.47 (m, 3H, Ar-H and 1H, olefinic H), 7.08 (d, 1H, Ar-H), 3.99 (s, 3H, OCH_3), 3.38 (t, 4H, N-CH_2), 1.83 (q, 4H, CH_2). ^{13}C NMR (50MHz, CDCl_3 , ppm) δ : 191.05, 157.36, 142.94, 137.97, 135.20, 133.13, 131.40, 128.90, 128.37, 128.11, 121.85, 112.76, 57.20, 48.05, 26.09. Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{S}$: C, 64.67; H, 5.70; N, 3.77; S, 8.63. Found C, 64.22; H, 5.62; N, 3.83; S 8.49 %.

Compound **3d**: Yield 38%, m.p. 158-158°C, IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 1661, 1596, 1152, 1109, 699. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , ppm) δ : 8.23 (d, 1H, Ar-H), 8.03 (d, 2H, Ar-H), 7.77 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, olefinic H), 7.74 (d, 1H, Ar-H), 7.45 (m, 3H, Ar-H and 1H, olefinic H), 7.08 (d, 1H, Ar-H), 3.99 (s, 3H, OCH_3), 3.74 (t, 4H, O-CH_2), 3.27 (t, 4H, N-CH_2). ^{13}C NMR (50MHz, CDCl_3 , ppm) δ : 190.06, 158.25, 142.46, 137.95, 135.18, 132.94, 131.12, 128.66, 128.50, 127.72, 126.92, 121.81, 112.79, 66.71, 56.32, 46.01. Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N O}_5\text{S}$: C, 62.00; H, 5.46; N, 3.62; S, 8.28. Found C, 61.70; H, 5.37; N, 3.73; S 8.05%.

Compound **3e**: Yield 47%, mp 200-202°C, IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3329, 1661, 1597, 1158, 693. ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6 , ppm) δ : 8.20 (s, 1H, Ar-H), 7.91 (d, 2H, Ar-H), 7.50 (m, 6H, Ar-H), 7.44 (d, $J=15.7$ Hz, 1H, olefinic H), 7.02 (m, 5H, Ar-H), 4.10 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (50MHz, DMSO-d_6 , ppm) δ : 189.61, 157.49, 142.24, 137.53, 134.64, 132.50, 130.00, 128.65, 128.25, 127.24, 128.04, 126.93, 124.07, 120.17, 115.42, 56.05. Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N O}_4\text{S}$: C, 67.16; H, 4.87; N, 3.56; S, 8.15. Found C, 66.82; H, 4.77; N, 3.50; S 7.80%.

Compound **3f**: Yield 51%, m.p. 205-207°C, IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3249, 1660, 1598, 1496, 1147, 689. ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6 , ppm) δ : 8.15 (d, 1H, Ar-H), 8.01 (d, 2H, Ar-H), 7.65 (m, 5H, Ar-H), 7.60 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H, olefinic H), 7.56 (d, 1H, Ar-H), 7.26 (d, $J = 14.0$ Hz, 1H, olefinic H), 7.03 (d, 2H, Ar-H), 7.47 (s, 1H, Ar-H), 4.09 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (50MHz, DMSO-d_6 , ppm) δ : 190.05, 157.90, 142.42, 138.00, 135.88, 135.83, 133.22, 131.57, 130.41, 128.67, 128.92, 128.76, 128.53, 127.70, 122.96, 122.36, 112.88, 57.04. Anal. Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{Cl N O}_4\text{S}$: C, 61.75; H, 4.24; Cl, 8.29; N, 3.27; S, 7.49. Found C, 62.03; H, 4.22; N, 3.43; S 7.42%.

Compound **3g**: Yield 48%, mp 218-219°C, IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3238, 1652, 1590, 1495, 1160, 654. ^1H

NMR (200 MHz, CDCl₃, ppm) δ : 8.15 (s, 1H, Ar-H), 8.01 (d, 2H, Ar-H), 7.78 (d, J = 14.8 Hz, 1H, olefinic H), 7.67 (s, 1H, Ar-H), 7.55 (m, 4H, Ar-H), 7.01 (dd, 1H, Ar-H), 7.09 (d, J = 14.8 Hz, 1H, olefinic H), 7.24 (d, 1H, Ar-H), 4.09 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (50MHz, CDCl₃, ppm) δ : 190.04, 157.35, 142.09, 137.86, 136.03, 135.79, 133.00, 130.92, 130.14, 129.14, 128.68, 128.53, 128.16, 126.69, 122.78, 122.23, 120.26, 112.76, 56.83. Anal. Calcd for C₂₂ H₁₇ Cl₂ N O₄ S: C, 57.15; H, 3.71; Cl, 15.34; N, 3.03; S, 6.94. Found C, 56.93; H, 3.71; N, 3.09; S 6.50%. Compound **3h**: Yield 60%, m.p. 183-185°C, IR (KBr, cm⁻¹) ν_{\max} : 3242, 1659, 1595, 1154, 643. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ : 8.1 (d, 2H, Ar-H), 8.09 (d, 2H, Ar-H), 7.73 (d, J = 15.7 Hz, 1H, olefinic H), 7.69 (d, J = 15.7 Hz, 1H, olefinic H), 7.50 (m, 3H, Ar-H), 7.02 (m, 5H, Ar-H), 4.09 (s, 3H, OCH₃), 3.67 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (50MHz, DMSO-d₆, ppm) δ : 189.68, 158.52, 157.00, 143.10, 138.23, 135.83, 133.78, 131.44, 130.77, 129.44, 129.22, 127.76, 127.55, 122.05, 115.42, 114.87, 57.25, 55.76. Anal. Calcd for C₂₃ H₂₁ N O₅ S: C, 65.23; H, 5.00; N, 3.31; S, 7.57. Found C, 65.58; H, 4.92; N, 3.41; S 7.40%. Compound **3i**: Yield 42%, m.p. 167-169°C, IR (KBr, cm⁻¹) ν_{\max} : 3210, 1655, 1591, 1162, 693. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, ppm) δ : 8.25 (s, 1H, Ar-H), 8.04 (d, 2H, Ar-H), 7.73 (d, J = 15.8 Hz, 1H, olefinic H), 7.63 (d, 1H, Ar-H), 7.42 (m, 4H, Ar-H), 7.14 (d, J = 15.8 Hz, 1H, olefinic H), 7.03 (m, 4H, Ar-H), 6.94 (d, 1H, Ar-H), 5.2 (t, 1H, NH), 4.14 (d, 2H, CH₂), 4.09 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (50MHz, CDCl₃, ppm) δ : 190.73, 157.99, 143.12, 138.63, 136.75, 135.96, 133.65, 129.99, 129.37, 129.21, 129.09, 128.57, 122.51, 113.10, 57.17, 48.43. Anal. Calcd for C₂₃ H₂₁ N O₄ S: C, 67.79; H, 5.19; N, 3.44; S, 7.87. Found C, 67.52; H, 5.11; N, 3.50; S 7.62%.

4.2. Biology

4.2.1. *Drugs*: All sulfonamides 4-methoxychalcone derivatives (**3**, **3a-3i**) were added in cultures as a dimethyl sulfoxide (DMSO) solution (50 μ M). The final solvent (DMSO) concentrations never exceeded 1% (v/v) and had no effect on the parasites proliferation or morphology.

4.2.2. *Parasites and cell line*: *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M-2904) promastigotes were grown at 28°C in Schneider's supplemented with 5% of heat inactivated fetal bovine serum (FBS). *Trypanosoma cruzi* (Y strain) epimastigotes were grown at 28°C in LIT medium supplemented with 10% of FBS. The J774.A1 macrophage cell line was cultivated in RPMI 1640 (Gibco BRL) medium supplemented with 2g/L of sodium bicarbonate and 10% of FBS without Hepes.

4.2.3. Antiparasite Assays:

4.2.3.1. Promastigotes

For the parasite growth inhibition assays, *Leishmania* promastigotes were harvested on the exponential phase of growth and the concentration was adjusted to 10×10^6 parasites/mL in Schneider's medium plus 5% FBS. The compounds solubilized in DMSO were diluted to appropriate concentrations ranging from 100 to 1.6 μ M in culture medium. One hundred μ L of the parasite suspension was added to 96-well plates and incubated at 28°C for 72h in the presence of different compounds concentrations. Amphotericin B (ranging from 31.25 to 1,000 nM) was used as positive control and DMSO 1% was used as negative controls. Three experiments were carried out in triplicate, and the number of live parasites was determined by counting in Neubauer chamber. The

50% inhibitory concentrations (IC_{50}) were determined by linear regression analysis, and represent the mean \pm standard error of three independent experiments (GraphPad Software, San Diego, CA). The IC_{50} for Pentamidine Isothionate was obtained from Lima et al (2004) [25].

T. cruzi epimastigotes were harvested at the exponential phase of growth and the concentration adjusted to 5×10^6 parasites/ml in LIT medium plus 10% FBS. One hundred μ L of the parasite suspension was added to 96-well plates and incubated at 28°C for 72h in the presence of different compounds concentrations (ranging from 100 to 1.6 μ M). Benzonidazole 10 μ M was used as positive control and DMSO 1% was used as negative control. Experiments were carried out in triplicate, and the number of live parasites was determined by counting in Neubauer chamber.

4.2.3.2. Amastigotes

L. braziliensis axenic amastigotes were obtained by differentiation of promastigotes from the stationary phase in Schneider medium plus 20% FBS pH 6.3 at 34°C for 72 hours in 25 cm² tissue culture flasks [34]. The J774.A1 cells were removed by scrapping and incubated at 34°C with axenic amastigotes at a 10:1 parasite:cell ratio in RPMI medium supplemented with 20% FBS and maintained under gentle shaking overnight. One hundred microliters of the cell suspension was seeded on 13mm glass coverslips in 24 well plates, and incubated with different **3i** concentrations (1-100 μ M) for 48 hours at 34°C / 5% CO₂. After that, coverslips were air-dried, methanol fixed, Giemsa stained. The rate of cell infection as well as the number of amastigotes per cell was

microscopically evaluated (1,000x) by counting 200 random cells in at least of two independent experiments in duplicate. The percentage of inhibition (PI) was calculated according to Guru et al. (1989) and values higher than 25% were considered significative. Amphotericin B was used as positive control, and DMSO 1% as negative control.

4.2.4. Cytotoxic assays: Mouse peritoneal macrophages were harvested from the peritonea of healthy mice after injection of 5 ml sterile phosphate saline buffer (PBS) containing EDTA 0.5%. Cells (5×10^5 cells/ml) were cultivated for 72 hours at 37°C in 96-well microplates in DMEM medium supplemented with 10% of FBS in the presence of different compounds concentrations. The cytotoxic effect of chalcones was assessed by the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] assay [35-36]. The 50% cytotoxicity concentrations (CC_{50}) were determined by linear regression analysis and represent the mean \pm standard error of three independent experiments (GraphPad Software, San Diego, CA).

4.3. Molecular Modeling Methodology

Molecular modeling was performed using SPARTAN'04 (Wavefunction Inc. Irvine, CA, 2000) and Osiris programs (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/druglikeness.html>) as described elsewhere [19, 24, 28-30]. Structures were minimized and the equilibrium geometry was obtained in vacuum using a semi-empirical AM1 module. In order to evaluate the electronic properties of the AM1 minimal energy conformations, they were submitted to a single-point

calculation using DFT (Density Functional Theory) method with a 6-31-G* basis set of the SPARTAN'06 package. The three-dimensional isosurfaces of the molecular electrostatic potential maps (MEPs) at the van der Waals contact surface represented electrostatic potentials superimposed onto a surface of constant electron density (0.002 e/au^3). They were generated in a range from -65 to $+23 \text{ kcal/mol}$. These color-coded isosurface values provide an indication of the overall molecular size and location of negative (red) or positive (blue) electrostatic potentials. The electronic properties (HOMO energy, HOMO orbital coefficients distribution, LUMO density, dipole moment, dipole moment vector and lipophilicity-cLogP) were calculated for all compounds. Hydrogen bond acceptor and donor, molecular weight and volume and the theoretical toxicity properties were calculated in the Osiris Property Explorer property (<http://www.organic-chemistry.org/>) and in the *in silico* screening program (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>).

5. Acknowledgements

The authors thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq (Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Universidade Federal Fluminense (UFF) for the financial support and scientist fellowships.

6. References

1. P. T. Leopoldo, P. R. Machado, R. P. Almeida, A. Schriefer, A. Giudice, A. R. de Jesus, J. L. Ho, L. H. Guimarães, O. Bacellar, E. M. Carvalho, BMC Infect Dis. 6 (2006) 75-80.

2. P. Trouiller, P. Olliaro, E. Torreele, J. Orbinski, R. Laing, N. Ford, *Lancet*. 22 (2002) 2188-2194.
3. S. L. Croft, G. H. Coombs, *Trends Parasitol.* 19 (2003) 502-508.
4. M. Chen, L. Zhai, S. B. Christensen, T. G. Theander, A. Kharazmi, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 2023-2029.
5. S. Singh, R. J. Sivakumar, *J. Infect. Chemother.* 10 (2004) 307-315.
6. A. Ali, *Ethiopy J. Med.* 40 (2002) 37-49.
7. Z. Nowakowska, *Eur.J. Med. Chem.* 42 (2007)125-137.
8. H. K. Hsieh, T. H. Lee, J. P. Wang, J. J. Wang, C. N. Lin, *Pharm. Res.* 15 (1998) 39-46.
9. F. Lunardi, M. Guzela, A. T. Rodrigues, R. Correa, I. Eger-Mangrich, M. Steindel, E. C. Grisard, J. Assreuy, J. B. Calixto, A. R. Santos, *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003) 1449-1451.
10. S. F. Nielsen, T. Boesen, M. Larsen, K. Schonning, H. Kromann, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 3047-3054.
11. F. Uchiumi, T. Hatano, H. Ito, T. Yoshida, S-I. Tanuma, *Antiviral Res.* 58 (2003) 89-98.
12. J-H. Wu, X-H. Wang, Y-H. Yi, K-H. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2003) 1813-1818.
13. M. Cabrera, M. Simoens, G. Falchi, M. L. Lavaggi, O. E. Piro, E. E. Castellano, A. Vidal, A. Azqueta, A. Monge, A. L. de Ceráin, G. Sagrera, G. Seoane, H.Cerecetto, M. González, *Bioorg Med Chem.* 15 (2007) 3356-3367.
14. M. L. Go, M. Liu, P. Wilairat, P. J. Rosenthal, K. J. Saliba, K. Kirk, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 3241-3245.

15. L. Ni, C. Q. Meng, J. Sikorski, *Expert Opin. Ther. Patents*, 14 (2004) 1669-1691.
16. P. Boeck, C. A. B. Falcão, P. C. Leal, R. A. Yunes, V. Cechinel Filho, V. E. C. Torres-Santos, B. Rossi-Bergmann, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 1538-1545.
17. J. Piñero, R. M. Temporal, A. J. Silva-Gonçalves, I. A. Jiménez, I. L. Bazzocchi, A. Oliva, A. Perera, L. L. Leon, B. Valladares, *Acta Trop.* 98 (2006) 59-65.
18. M. M. Salem, K. A. J. Temporal, *J. Nat. Prod.* 69 (2006) 43-49.
19. G. Bhattacharya, M.M. Salem, K.A. Werbovetz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12 (2002) 2395-2398.
20. M. S. Costa, N. Boechat, E. A. Rangel, F. de C. da Silva, A. M. de Souza, C. R. Rodrigues, H. C. Castro, I. N. Junior, M. C. Lourenco, S. M. Wardell, V. F. Ferreira, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2006) 8644-8653.
21. B. S. Furniss, A. J. Hannaford, P. W. Smith, A. R. Tatchell, In: A. I. Vogel, B. S. Furniss (Eds.), *Vogel's textbook of practical organic chemistry*, Longman Scientific & Technical, New York, 1989, pp 75-98.
22. J. R. Cremling, F. J. Swinbourne, O. O. J. Shode, *Chin. Chem. Soc.* 31 (1984) 383-388.
23. R. J. Cremling, F. J. Swinbourne, P. Bassin, D. Dane, K. Higgins, P. Mitchell, J. A. S. Cavaleiro, F. J. Domingues, M. Dias, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem.* 63 (1991) 385-395.
24. V. F. Ferreira, A. Jorquera, A. M. Souza, M. N. da Silva, M. C. de Souza, R. M. Gouvêa, C. R. Rodrigues, A. V. Pinto, H. C. Castro, D. O. Santos, H. P. Araújo, S. C. Bourguignon, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2006) 5459-5466.

25. N. M. F. Lima, C. S. Correia, L. L. Leon, G. M. C. Machado, M. F. Madeira, A. E. G. Santana, M. O. F. Goulart, Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 99 (2004) 757-761.
26. L. Zhai, J. Blom, M. Chen, S. B. Christensen, A. Kharazmi, Antimicrob. Agents Chemother. 39 (1995) 2742-2748.
27. L. Zhai, M. Chen, J. Blom, S. B. Christensen, T. G. Theander, A. Kharazmi, J. Antimicrob. Chemother. 43 (1999) 793-803.
28. A. M. Bernardino, H. C. Castro, I. C. Frugulhetti, N. I. Loureiro, A. R. Azevedo, L. C. Pinheiro, T. M. Souza, V. Giongo, F. Passamani, U. O. Magalhães, M. G.; Albuquerque, L. M. Cabral, C. R. Rodrigues, Bioorg. Med. Chem. 16 (2008) 313-321.
29. L. R. Dias, M. B. Santos, S. Albuquerque, H. C. Castro , A. M. de Souza, A. C. Freitas, M. A. DiVaio, L. M. Cabral, C. R. Rodrigues, Bioorg. Med. Chem. 15 (2007) 211-219.
30. A. M. Bernardino, L. C. da Silva Pinheiro, C. R. Rodrigues, N. I. Loureiro, H. C. Castro, A. Lanfredi-Rangel, J. Sabatini-Lopes, J. C. Borges, J. M. Carvalho, G. A. Romeiro, V. F. Ferreira, I. C. Frugulhetti, M. A. Vannier-Santos, Bioorg. Med. Chem. 15 (2006) 5765-5770.
31. C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, Adv. Drug Deliv. Rev. 23 (2001) 3-26.
32. D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. J. Kopple, J. Med. Chem. 45 (2002) 2615-2623.
33. I.V. Tetko, Drug Discov. Today. 15 (2005) 1497-500.
34. J. M. F. Balanco, E. M. Pral, S. da Silva, A. T. Bijovsky, R. A. Mortara, S. C. Alfieri, Parasitology 116 (1998) 103-113.

35. T. J. Mosmann, J. Immunol. Methods 65 (1983) 55-63.
36. A. Sieuwerts, J. G. M. Klijn, H. A. Peters, J. A. Foekens, Eur J Clin Chem Clin Biochem, 33 (1995) 813-823.

Figures legends

Figure 1: Biological evaluation of 4-methoxychalcone (**3**) and sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives (**3a-i**). Inhibitory effects on *L. braziliensis* in vitro proliferation (**A**), cytotoxicity profile on mouse macrophages (**B**), selectivity index (**SI**) calculated as described by Ferreira et al., 2006 [24] (**C**) and the inhibition of the amastigotes infection on macrophages by the most active compound (**3i**) (D).

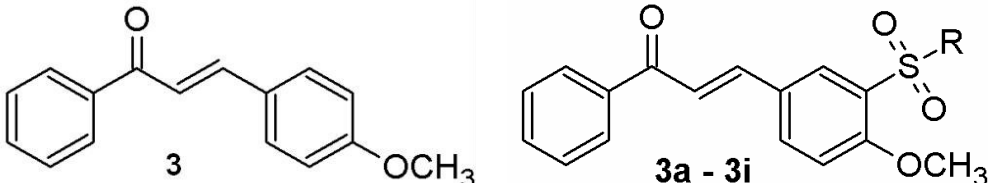
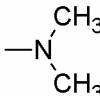
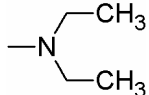
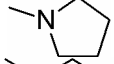
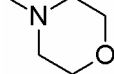
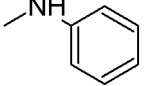
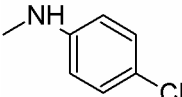
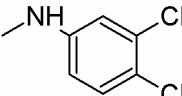
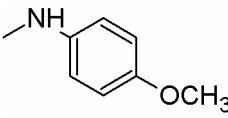
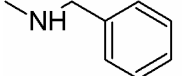
Figure 2: Minimal energy Conformation (A), HOMO density encoded onto a van der Waals surface (B) and electrostatic potential map (C) of 4-methoxychalcone (**3**) and sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives (**3a-3i**). HOMO absolute density coefficient (isodensity 0.002 e/au³) mapped from deepest red (0.00) to deepest blue (0.02). The chalcone moiety of all molecules is turned to the front in (A), (B) and (C). The position is slightly altered in (B) and (C) to allow a better view of the parameters analyzed.

Figure 3: Structural alignment of the most (**3i**) and the less active (**3e**) derivatives of the sulfonamide 4-methoxychalcone series (A), and the druglikeness and drugscore values (B) and the theoretical toxicity evaluation (C) of the most active compounds (**3b**, **3d**, **3f** and **3i**) compared to the non-substituted 4-methoxychalcone and antileishmanial drugs. (A) The most (**3i**) and the less active (**3e**) compounds are represented in stick and ball colored by element (Grey = carbon, white = hydrogen, blue = nitrogen, red = oxygen and orange = sulfur. The white color in the CPK structure shows the chalcone and sulfonamide parts in these compounds (**3i** and **3e**) whereas green represents the contributing region of the most active compound (**3i**) and purple indicates the prohibitive region of the less active derivative (**3e**).

Scheme 1. Rational approach to design the sulfonamides 4-methoxychalcones derivatives.

Scheme 2. Synthetic approach used to obtain the sulfonamides 4-methoxychalcones derivatives.

Table 1: Comparison of the antileishmanial activity (IC_{50}) of 4-methoxychalcone (**3**) and sulfonamides 4-methoxychalcone derivatives (**3a–i**) with their theoretical molecular electronic properties (Dipole, E_{HOMO} , E_{LUMO} , cLog P, Volume, Molecular weight - MW) and Lipinski profile, including the number of Hydrogen Bond Donor and Acceptor Groups (HDG and HAG respectively).

											
C	R	IC ₅₀ (μM)	Dipole (Debye)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	Volume (Å ³)	HDG	HAG	clogP	MW	
3	-	16.6 ± 1.6	3.39	-8.43	2.01	263.80	0	2	3.63	238.29	
3a		8.6 ± 0.4	7.32	-8.38	2.04	346.07	0	5	2.61	345.42	
3b		5.6 ± 0.4	8.95	-8.40	2.09	382.91	0	5	3.29	373.47	
3c		13.0 ± 1.3	7.23	-8.76	0.95	371.83	0	5	2.93	371.46	
3d		5.9 ± 1.3	7.31	-8.59	1.87	379.89	0	6	2.21	387.46	
3e		69.0 ± 3.7	8.67	-8.57	1.87	391.84	1	5	4.04	393.46	
3f		4.6 ± 1.3	8.20	-8.19	2.09	405.13	1	5	4.60	427.91	
3g		8.1 ± 1.6	7.84	-8.89	0.951	418.27	1	5	5.16	462.35	
3h		7.5 ± 0.8	7.56	-8.27	2.06	419.38	1	6	3.91	423.49	
3i		3.5 ± 0.6	7.17	-8.59	1.87	410.52	1	5	4.11	407.49	

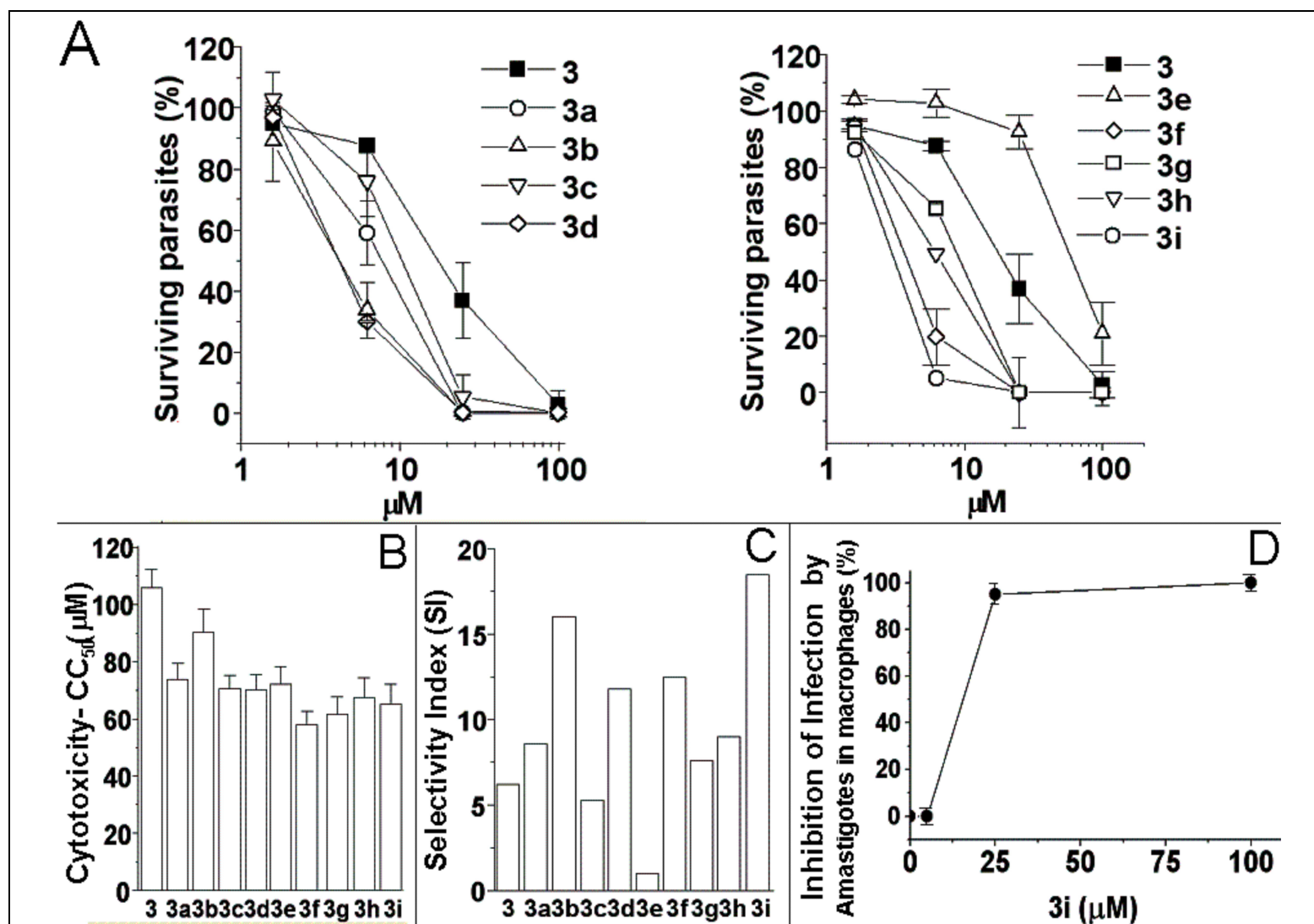


Figure1

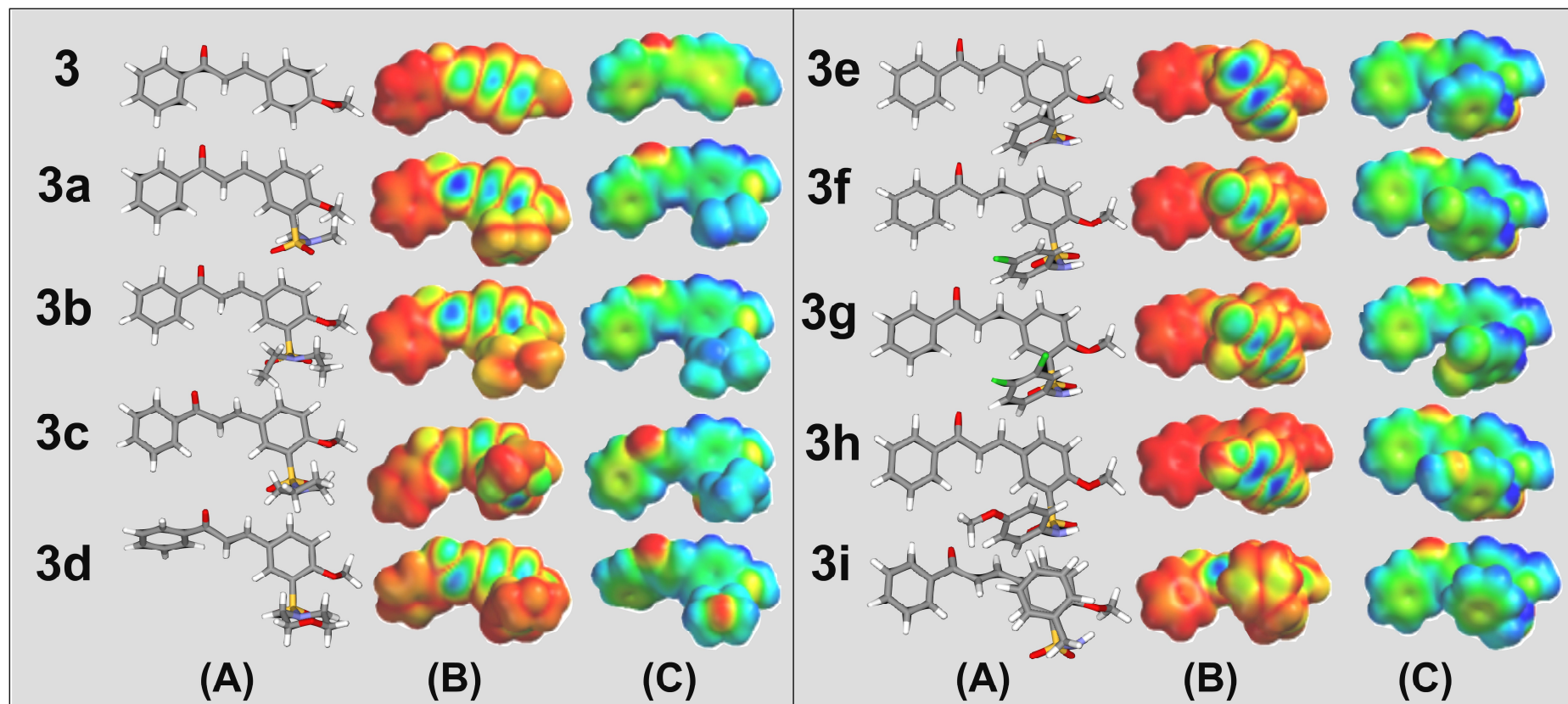


Figure 2

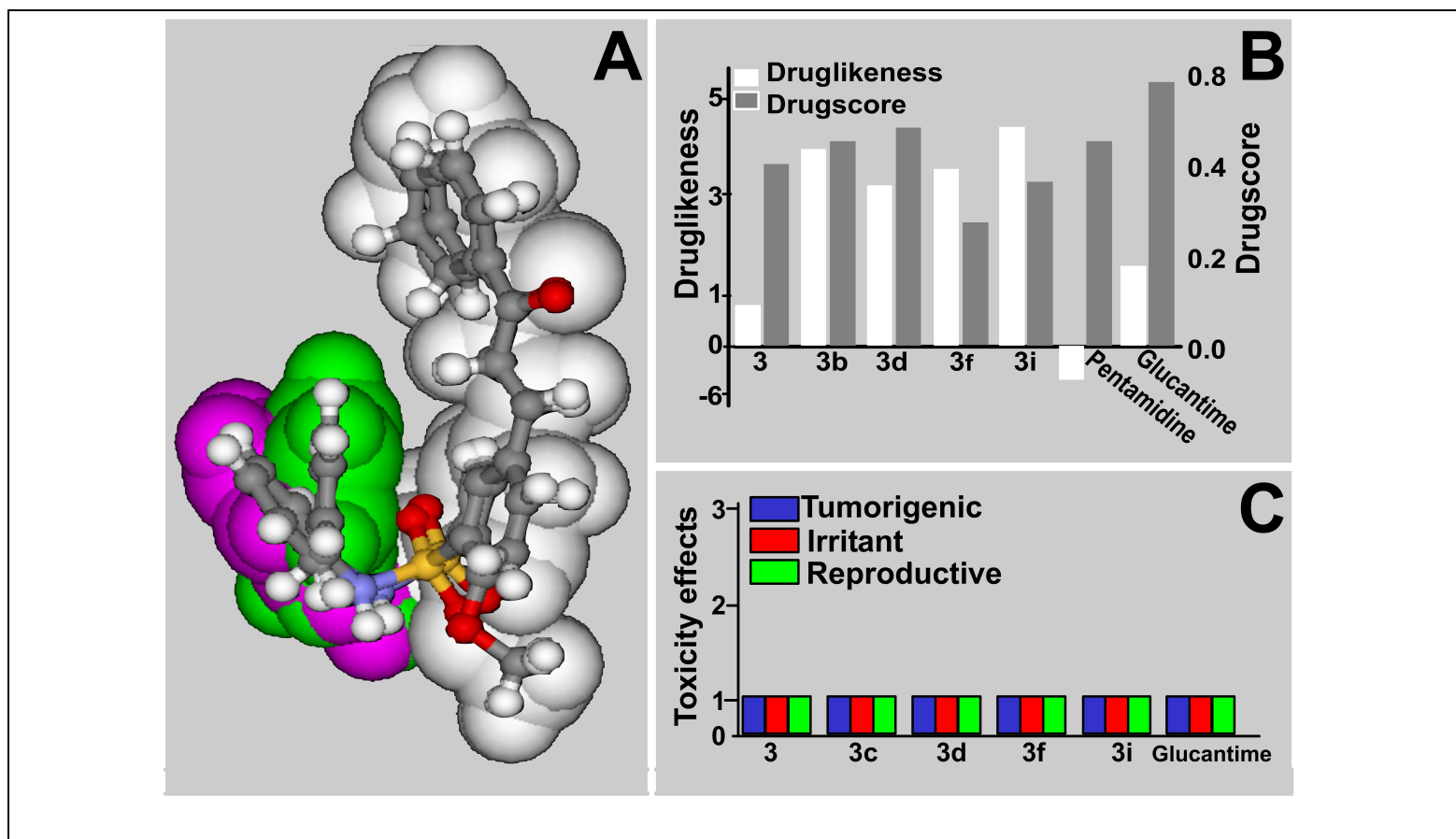
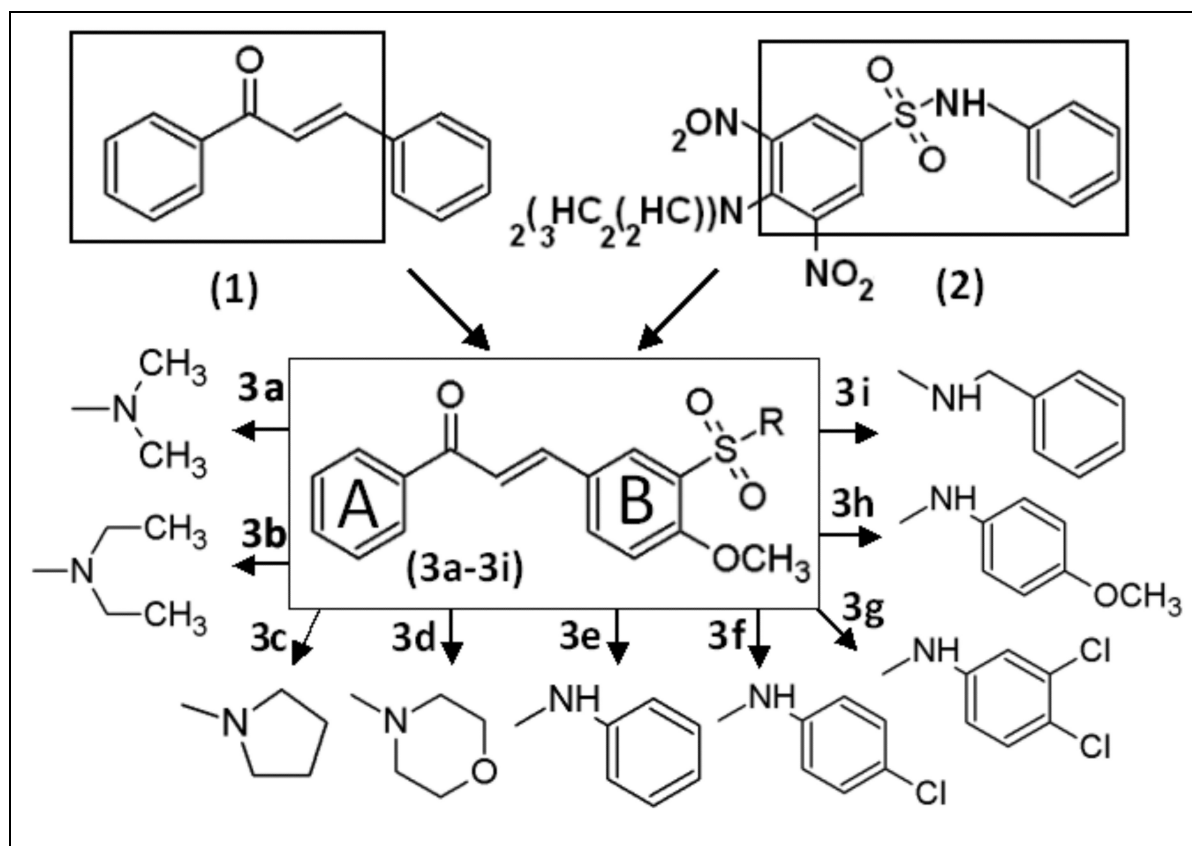
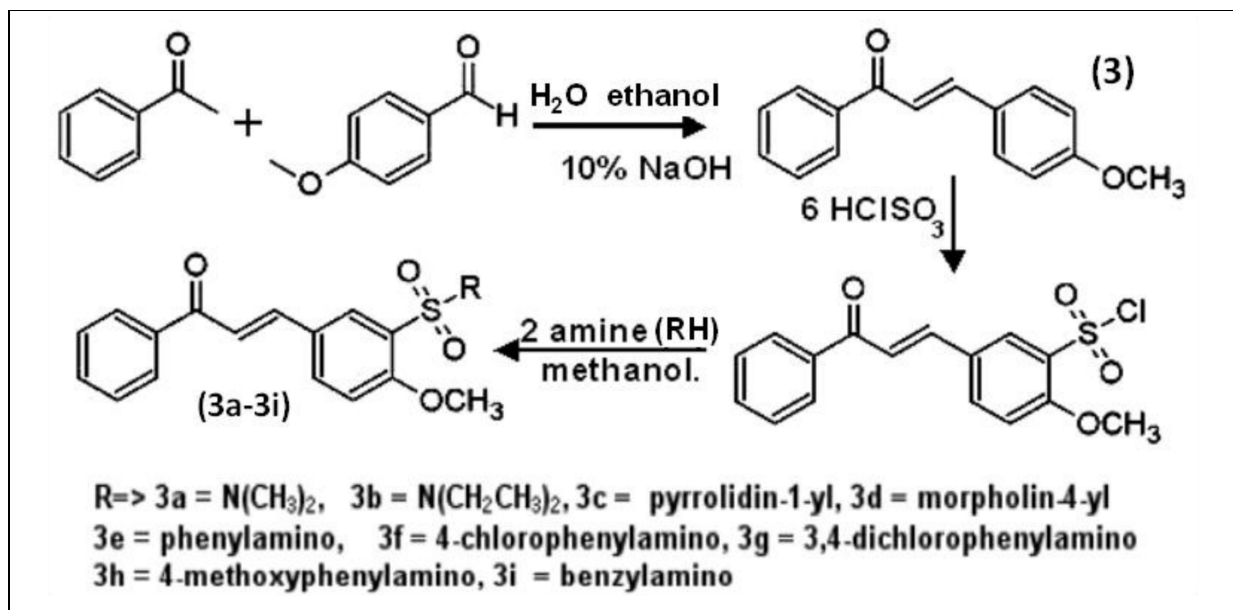


Figure 3



Scheme 1



Scheme 2